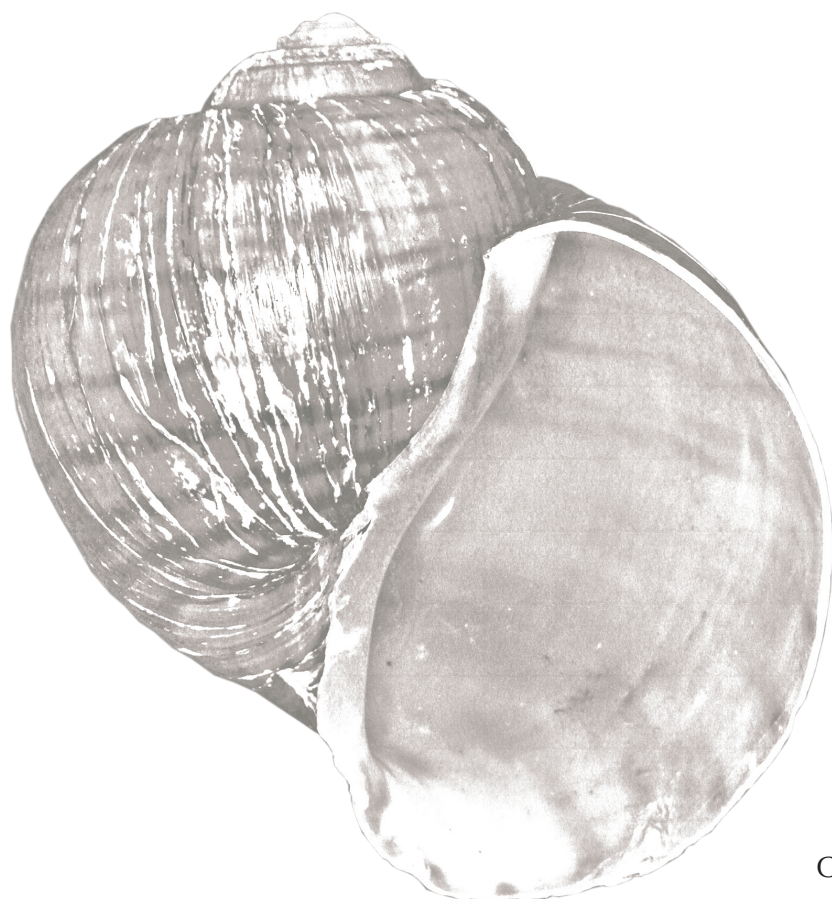


TESIS DOCTORAL

Estrategias reproductivas de moluscos gasterópodos.
Caracterización bioquímica y toxicidad de la glándula
del albumen de *Pomacea canaliculata*
(Gastropoda: Ampullariidae)

María Pilar Cadierno



Director **Horacio Heras**

Codirector **Marcos Sebastián Dreón**

La presente tesis doctoral fue realizada

en el **Instituto de Investigaciones Bioquímicas**

de La Plata, "Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner"

de la Facultad de Ciencias Médicas

(UNLP – CONICET CCT La Plata)

Dedicado a
Blas, Claudia y Francisco

Agradezco enormemente:

A la UNLP por la formación y las oportunidades, humanas y académicas.

A los organismos de Ciencia y Tecnología del país por haber apoyado esta tarea a través de las becas y subsidios.

A mis directores, Horacio y Marcos, por haber confiado en mí para el desarrollo de esta Tesis, y fundamentalmente por su permanente acompañamiento y enseñanzas.

A mi familia, en especial a mis padres y mi hermano, quienes siempre me acompañan, me apoyan y alientan incondicionalmente.

A los tantos integrantes del INIBIOLP que he tenido la suerte de conocer y compartir entre experimentos y pasillos.

A mis maravillosos compañeros del laboratorio, Yani, Santi, Tabi, Mati y Leti, testigos de este trabajo y piezas fundamentales del día a día.

Al hermoso grupo del Laboratorio de Ecología, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la UNS, por haberme recibido tan cálidamente, en especial a Pablo, Silvana y Lucía, por su gran aporte y las valiosas discusiones que hemos tenido.

A mis grandes amigos "Pishers", amigos que los kilómetros no han logrado separar, en especial a Sol, Elena, Mica y Male.

Resumen

Pomacea canaliculata, gasterópodo dulceacuícola de origen sudamericano, es la especie más sobresaliente de la familia Ampullariidae. Ha sido introducida en el sudeste asiático e islas del Océano Pacífico donde se ha convertido en una seria plaga para la agricultura, principalmente en cultivos de arroz y taro. Su presencia en estas zonas, así como en América Central y América del Sur, representa también un riesgo sanitario para la población, ya que es un hospedador intermediario del nematode *Angiostrongylus cantonensis*, agente causal de la meningoencefalitis eosinofílica, enfermedad potencialmente fatal para el hombre. Su invasión también ha mostrado un impacto ecológico en los ecosistemas acuáticos invadidos. Conocer su reproducción, es de especial interés debido a lo anteriormente mencionado. Los huevos son depositados fuera del agua, característica compartida con las restantes especies del género, formando masas de huevos de una intensa coloración rosada. La especie presenta una alta fecundidad, siendo una hembra capaz de depositar un total de 1.300 a 11.000 huevos a lo largo de su vida en condiciones de laboratorio. En los ampuláridos, así como en la mayor parte de los gasterópodos, el vitelo es de escaso desarrollo y en su lugar, el material nutritivo necesario para el desarrollo embrionario, se ubica externamente al embrión y se denomina fluido perivitelino (FPV). El FPV, en las especies de ampuláridos estudiadas, ha mostrado tener además, propiedades de protección ante factores bióticos y abióticos. Estas actividades biológicas se encuentran asociadas a las principales perivitelinas (proteínas del FPV), que en el caso de *P. canaliculata* se denominan PcOvo y PcPV2. En un contexto evolutivo, considerando que los huevos prácticamente no presentan depredadores, algunas de las actividades biológicas de las perivitelinas, como las propiedades antinutritivas, antidiigestivas y neurotóxicas han sido interpretadas como una adquisición clave asociada a la oviposición aérea como defensa contra la depredación de los embriones en desarrollo. El FPV es sintetizado por un órgano accesorio del sistema reproductor femenino, la glándula del albumen (GA), también de llamativa coloración, que contribuye significativamente a la biomasa corporal de las hembras. Se desconoce en *P. canaliculata*, y en los gasterópodos en general, si durante su síntesis las perivitelinas están sujetas a modificaciones estructurales significativas, como sufren los precursores de las proteínas del vitelo o vitelinas, presentes en otros invertebrados y funcionalmente análogas, o si en cambio las

perivitelinas son almacenadas en la GA ya en su forma final, biológicamente activa. En *P. canaliculata* existen indicios que apoyan esta última hipótesis, ya que los depredadores de caracoles adultos descartan la GA cuando se alimentan de hembras. Conocer una explicación para este comportamiento, desde un ángulo bioquímico, resulta interesante en lo que respecta al mecanismo de síntesis de perivitelinas, y al mismo tiempo en relación a la ecología de los depredadores de adultos del género *Pomacea* siendo que el motivo de dicho comportamiento y sus consecuencias nutricionales no han sido evaluados hasta el presente.

La presente tesis doctoral tiene como objetivos generales: (1) contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de *P. canaliculata* y, (2) contribuir al entendimiento de la perivitelogénesis en la GA desde una perspectiva bioquímica, su vínculo con el alto rendimiento reproductivo de la especie y su relación con los hábitos alimenticios de los depredadores de especies del género *Pomacea*. En particular se pretende aportar la primera información en gasterópodos sobre la síntesis de perivitelinas en lo referido a la estructura de sus precursores determinando si PcOvo y PcPV2 almacenadas en la GA presentan diferencias estructurales y funcionales respecto a las formas finales en el huevo. Esta información representaría a su vez un abordaje molecular para ayudar a explicar las causas del comportamiento de descarte de la GA exhibida por los depredadores de adultos de *P. canaliculata*, siendo que el órgano resultaría nocivo para los mismos. Por otro lado, se aborda dicho comportamiento desde una perspectiva ecológico-nutricional determinando si el consumo de hembras de *P. canaliculata* representa una desventaja energética para los depredadores como consecuencia del descarte de la GA. Por último, se evalúa la respuesta de la GA frente a la actividad reproductiva de cópula y oviposición, y ante distintos niveles de esfuerzo reproductivo en lo que respecta a la acumulación de los principales componentes de secreción y la expresión de las principales perivitelinas.

Para llevar a cabo este estudio se realizó un análisis comparativo de la estructura-función de las perivitelinas PcOvo y PcPV2 aisladas de huevo y de la GA. Se analizó su movilidad electroforética, tiempo de retención en columnas cromatográficas y estructura nativa secundaria, terciaria y cuaternaria mediante espectroscopía de absorción, fluorescencia, dicroísmo circular y dispersión de rayos X a bajo ángulo (propiedades estructurales). A su vez se evaluó la resistencia a la digestión, el grado de neurotoxicidad y capacidad inhibitoria de tripsina del órgano (propiedades funcionales). Los resultados evidenciaron que la GA almacena las perivitelinas en sus formas

maduras, biológicamente activas y ya listas para ser incorporadas a los huevos, a diferencia de los demás invertebrados que sintetizan formas inactivas que requieren de un procesamiento proteolítico previo u otras modificaciones importantes en su estructura antes de ser incorporadas en el huevo. Esto probablemente represente una vía más eficiente para la conversión de alimento en huevos, haciendo posible un alto rendimiento reproductivo. Por otro lado, los estudios funcionales indicaron que la GA presenta propiedades antinutritivas, antidigestivas y neurotóxicas, lo que explicaría plausiblemente el comportamiento de descarte del órgano por parte de los depredadores de hembras adultas de la especie.

A continuación se evaluaron las consecuencias nutricionales asociadas a dicho comportamiento. Se determinó la composición bioquímica y el contenido energético de los tejidos de machos y hembras de *P. canaliculata* y se estimó la variación de estos parámetros en función de la talla. Los resultados indicaron que el consumo de hembras sería desventajoso desde una perspectiva energética y nutricional. Determinamos que a una misma talla, y sin considerar la GA, una hembra y un macho presentan un contenido de biomasa comparable. Sin embargo, los tejidos consumibles de las hembras presentan un contenido significativamente menor de proteínas y aproximadamente un 19% menos de energía que un macho de tamaño equivalente. Estos resultados reflejan la gran contribución de la GA a la biomasa corporal de la hembra, y la energía destinada y movilizada hacia este órgano durante la reproducción.

Por último, se estudió la dinámica de la GA en respuesta al esfuerzo reproductivo y a la actividad reproductiva de cópula y oviposición. Se observó una recuperación de los principales componentes de secreción invertidos en las puestas (proteínas, polisacáridos y calcio) tal que la biomasa total de huevos depositada prácticamente duplicó la biomasa inicial de la GA. Sin embargo, luego de un esfuerzo reproductivo alto, el órgano no recuperó su capacidad reproductiva inicial en relación a los niveles de proteínas solubles, PcOvo y PcPV2 en particular, y de polisacáridos, mientras que los niveles de calcio total se recuperaron completamente. Frente a un esfuerzo reproductivo alto se observó también una reducción en el número de huevos por puesta. Estos resultados indican que la GA tiene una capacidad diferencial para recuperar sus componentes de secreción, presentándose la biosíntesis como uno de los factores limitantes para el proceso de oviposición a largo plazo.

En conjunto, los resultados de la presente tesis doctoral indican que la fisiología y bioquímica de la GA está fuertemente relacionada con la alta capacidad reproductiva de

P. canaliculata, siendo el principal órgano especializado que permite la rápida movilización de cantidades significativas de nutrientes hacia la futura progenie, y de manera coordinada con la actividad reproductiva. Parte de estas características probablemente estén dadas por la capacidad de sintetizar partículas estructuralmente complejas y multifuncionales como las perivitelinas de manera directa, es decir sin modificaciones postraduccionales previas, en contraste con sus análogas, las vitelinas de otros invertebrados. Por último, la observación de que la biosíntesis de componentes del FPV sería un factor limitante para el proceso de oviposición a largo plazo, sugiere inmediatamente un blanco de utilidad para el control poblacional de esta especie invasora.

Abstract

The South-American freshwater gastropod, *Pomacea canaliculata*, is the most conspicuous species of the Ampullariidae family. It has been introduced to South East Asia and Pacific Islands where it has become a serious pest in rice and taro crops. In these regions, as well as in Central and South America, it also represents a sanitary risk for the human population, as it is an intermediate host of *Angiostrongilus cantonensis*, a nematode that causes eosinophilic meningoencephalitis which is a potentially fatal disease. This species has also been responsible for ecological impacts on invaded wetlands. The knowledge on its reproduction is therefore of special interest. As all members of the genus, *P. canaliculata* lays their eggs out of the water in conspicuous bright pink-reddish masses. The species has a high fecundity, a female being able to lay a total of 1,300 - 11,000 eggs under laboratory conditions. As in most gastropods, the vitellus is reduced in ampularids, and the nutrients for development are located outside the embryo, as a perivitelline fluid (PVF). Besides its role in embryo nutrition, the PVF has shown antinutritive, antidigestive, and/or neurotoxic properties, in all the ampularid species so far studied. These biological activities are associated to the main perivitellins (proteins of the PVF), which in *P. canaliculata* are called PcOvo and PcPV2. On an evolutionary context, the biological activity of perivitellins has been considered as key acquisitions associated to aerial oviposition for its role in embryo defenses against predation, rendering the eggs with virtually no predators. The PVF is synthesized by the albumen gland (AG), a female accessory reproductive organ widespread in gastropods, which also has a bright color in *Pomacea* and makes a significant contribution to the female body biomass. In *P. canaliculata*, and in gastropods in general, it is still unknown whether during its synthesis, the perivitellins, which are functionally analogous to vitellins (proteins of vitellus), are subjected to significant structural modification, as the precursors of vitellins are, or whether they are stored in the AG in its final form. There is evidence in *P. canaliculata* supporting the latter hypothesis, as the snail predators discard the AG when they feed on female snails. Trying to find an explanation for this behavior from a biochemical perspective is interesting regarding both, the perivitellins synthesis mechanism and the feeding ecology of *Pomacea* predators. The reasons for the already mentioned behavior and its nutritional consequences have not been evaluated yet.

This PhD thesis has the following general objectives: (1) to contribute to *P. canaliculata* reproductive biology knowledge, and (2) to contribute to the understanding of the perivitellogenesis in the AG from a biochemical point of view, its association with the species high fecundity and with the feeding habits of *Pomacea* predators. In particular, we expect to provide the first piece of information regarding perivitellin synthesis, structure and function of its precursors in gastropods, by determining whether PcOvo and PcPV2 stored within the AG have structural and functional differences compared to their respective egg final forms. At the same time this information would represent a molecular approach to help explain the behavior exhibited by *Pomacea* predators, as the AG could be noxious for them. Additionally, we address the predators' behavior from a nutritional and ecological perspective by evaluating whether feeding on a female of *P. canaliculata* represents an energetic disadvantage for predators after discarding its AG. Finally, we evaluate the effect of reproductive activity of mating and oviposition, and the effect of reproductive effort on the stored levels of the main AG secretion components, and on the gene expression levels of the main perivitellins.

To carry out this study, we began performing a comparative structure-function analysis of the perivitellins PcOvo and PcPV2 isolated from egg masses and from the AG. We compared these two sets of perivitellins regarding their structural properties: electrophoretic mobility retention time in chromatographic columns, native secondary, tertiary, and quaternary structure, as determined by a combination of spectroscopic methods, including absorbance, circular dichroism, fluorescence and SAXS. We also evaluated some of their functional properties such as digestion resistance, neurotoxicity, and the AG extracts ability to inhibit trypsin activity. Results showed that the AG stores structurally mature and biologically active perivitellins, in contrast to the other invertebrates which synthesize inactive precursors that require a subsequent proteolysis or other significant modifications before being incorporated to the eggs. This is probably a more efficient mechanism for food conversion into egg production, making it possible a high reproductive output. Additionally, functional studies showed that the AG has antinutritive, antidigestive, and neurotoxic properties, which provides the first explanation of the behavior exhibited by snail predators: when they feed on a female snail they discard the AG which, according to this Thesis results, would be noxious for them.

Then, we evaluated the nutritional consequences of the discarding behavior of snail predators. We determined the biochemical composition and the energetic content of *P.*

canaliculata male and female tissues, and we also estimated the variation of these parameters as a function of snail size. Results indicate that female consumption by snail predators would be disadvantageous from a nutritional and energetic point of view. At a same size, without considering the AG, a female and a male have a similar biomass content, though. Female edible tissues have significantly lower protein content, and around 19% less energy content than a male of equivalent size. These results reflect the large contribution of the AG to the female body biomass, and the energy females allocate to this organ for reproduction during the reproductive season.

Finally, we studied the AG physiological response to reproductive effort and to reproductive activity (mating and oviposition). We observed a restoring of the main secretion components (proteins, polysaccharides, and calcium) in the AG, in such a way that total egg biomass deposited nearly doubled the initial AG biomass. However, after a high reproductive effort, the restoring in the organ was not enough to maintain the initial reproductive potentiality for soluble proteins, PcOvo and PcPV2, and polysaccharides, while total calcium levels were completely restored. Additionally, in association with a high reproductive effort, a reduction in the number of eggs per clutch was observed. These results indicate that the AG has a differential ability to restore its organic and inorganic components, being biosynthesis a possible limiting factor to keep up with a high reproductive output.

In conclusion, the results of this PhD thesis indicate that the AG physiology and biochemistry is highly related to *P. canaliculata* remarkable fecundity. The AG seems to be the main specialized organ that enables a fast nutrient allocation to offspring, which is also coordinated with the reproductive activity. Part of these qualities could be related to its ability to synthesize in a direct way, multifunctional and structurally complex particles, as the main perivitellins are. This contrasts with vitellins synthesis of other invertebrates which require post-translational modifications. Finally, considering that the biosynthesis in the AG seems to be a limiting factor for the long-term oviposition, the factors affecting this process could be useful targets for future studies aiming at reducing fecundity which is of outmost importance considering the negative impact this species spread causes in non native areas.

Índice

1. Introducción	12
1.1. Aspectos generales de la familia Ampullariidae. <i>Pomacea canaliculata</i> como modelo	13
1.2. Biología reproductiva	15
2. Objetivos	21
3. Análisis estructural y funcional de las perivitelinas PcOvo y PcPV2 de la glándula del albumen	24
3.1. Introducción	25
3.1.1. Mecanismos vitelogénicos en animales ovíparos, singularidades de gasterópodos y <i>Pomacea canaliculata</i> como modelo para el estudio de la síntesis de perivitelinas	25
3.1.2. Precursores de perivitelinas en <i>Pomacea canaliculata</i> y su posible relación con el comportamiento de los depredadores de caracoles adultos	26
3.2. Objetivos e hipótesis	27
3.3. Metodología	27
3.3.1. Material biológico	27
3.3.2. Preparación de la fracción soluble conteniendo perivitelinas	28
3.3.3. Purificación de PcOvo y PcPV2	28
3.3.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida	28
3.3.5. Cromatografía líquida de intercambio aniónico	29
3.3.6. Cromatografía líquida de exclusión molecular	29
3.3.7. Cuantificación de proteínas mediante espectrofotometría	30
3.3.8. Espectroscopía de dicroísmo circular	30
3.3.9. Espectroscopía de fluorescencia	31
3.3.10. Espectroscopía de absorción	32
3.3.11. Dispersión de rayos X a bajo ángulo	32
3.3.12. Proteólisis parcial con proteinasa K	34
3.3.13. Digestión gastrointestinal simulada	34

3.3.14. Ensayo de inhibición de tripsina.....	35
3.3.15. Ensayo de toxicidad.....	37
3.4. Resultados.....	38
3.4.1. Caracterización estructural de las perivitelinas.....	38
3.4.1.1. Conformación nativa, tamaño y forma.....	38
3.4.1.2. Estructura secundaria y terciaria.....	42
3.4.1.3. Estabilidad estructural frente al pH.....	44
3.4.1.4. Susceptibilidad a la proteólisis limitada.....	45
3.4.2. Caracterización funcional de las perivitelinas	46
3.4.2.1. Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada.....	46
3.4.2.2. Inhibición de tripsina.....	47
3.4.2.3. Toxicidad.....	48
3.5. Discusión.....	48
 4. Evaluación del contenido energético-nutritivo de machos y hembras de <i>P. canaliculata</i>	 52
4.1. Introducción.....	53
4.2. Objetivos e hipótesis.....	54
4.3. Metodología.....	54
4.3.1. Composición bioquímica y contenido energético de los tejidos de <i>Pomacea canaliculata</i>	54
4.3.1.1. Material biológico.....	54
4.3.1.2. Cuantificación de lípidos.....	55
4.3.1.3. Cuantificación de proteínas totales.....	55
4.3.1.4. Cuantificación de polisacáridos.....	56
4.3.1.5. Cuantificación de carbohidratos solubles.....	56
4.3.1.6. Determinación del peso seco.....	57
4.3.1.7. Determinación del contenido de energía de los tejidos.....	57
4.3.1.8. Análisis estadístico.....	57
4.3.2. Biomasa y contenido energético de hembras y machos en función de la talla.....	57
4.4. Resultados.....	58
4.4.1. Composición bioquímica y contenido energético de los tejidos de <i>Pomacea canaliculata</i>	58

4.4.2. Estimación de la biomasa corporal de machos y hembras y su contenido de energía en función de la talla.....	59
4.5. Discusión.....	60
5. Dinámica de los principales componentes de secreción de la GA frente al esfuerzo reproductivo y la actividad reproductiva en <i>P. canaliculata</i>.....	63
5.1. Introducción.....	64
5.2. Objetivos e hipótesis.....	66
5.3. Metodología.....	66
5.3.1. Muestreo.....	66
5.3.2. Determinación del contenido de humedad.....	68
5.3.3. Preparación de la fracción soluble.....	68
5.3.4. Cuantificación de calcio total y calcio soluble.....	68
5.3.5. Cuantificación de los polisacáridos.....	69
5.3.6. Cuantificación de perivitelininas por ELISA.....	69
5.3.7. Espectroscopía de absorción.....	70
5.3.8. Cuantificación de la expresión génica de perivitelininas por q-PCR.....	70
5.3.8.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	70
5.3.8.2. Diseño de cebadores.....	71
5.3.8.3. PCR cuantitativa.....	71
5.3.8.4. Validación de genes de referencia.....	72
5.3.9. Análisis estadístico.....	75
5.4. Resultados.....	75
5.4.1. Datos morfológicos.....	75
5.4.2. Niveles de los principales componentes de secreción de la GA.....	77
5.4.3. Validación de genes de referencia y su empleo en la normalización de datos de expresión génica.....	78
5.4.4. Almacenamiento y niveles de expresión de PcOvo y PcPV2 en la GA.....	80
5.4.5. Análisis de la coloración del órgano.....	83
5.5. Discusión.....	84
5.5.1. Efecto de la actividad reproductiva y del esfuerzo reproductivo sobre la fisiología de la GA.....	84
5.5.2. Validación de genes de referencia en la GA de <i>Pomacea canaliculata</i>	87

6. Conclusiones generales.....	89
7. Consideraciones finales.....	92
8. Abreviaturas y símbolos.....	95
9. Bibliografía.....	97
10. Apéndice:	
Evaluación de la selección de presas por parte del gavilán caracolero en función de la talla y el sexo de las presas.....	107

1.

Introducción

1.1. Aspectos generales de la familia Ampullariidae. *Pomacea canaliculata* como modelo

Los ampuláridos son el grupo más diversificado y ecológicamente más relevante dentro de los gasterópodos de agua dulce. Se trata de un grupo de especies operculadas, enteramente de agua dulce, algunas estrictamente acuáticas y otras con hábitos anfibios. En lo referido a la reproducción, son dioicos, con fecundación interna y ovíparos (Hayes et al. 2015). Esta familia comprende 150 especies nominales distribuidas en 9 géneros. Se trata de un grupo de origen gondwánico que aparece por primera vez en el registro fósil en el Cretácico Inferior de África y en el Jurásico Superior de Asia (Hayes et al. 2009b). Actualmente ocupan ambientes húmedos de áreas tropicales y subtropicales de América, África y Asia, siendo América del Sur la región donde presentan el mayor grado de diversificación (Hayes et al. 2009a).

El género *Pomacea*, originario de América del Sur, es el más derivado de la familia. A su vez es el género con mayor número de especies y distribución geográfica más amplia, por lo cual es considerado el grupo más exitoso desde el punto de vista evolutivo dentro de esta familia (Hayes et al. 2009a). Con respecto a la distribución actual es importante mencionar que sus límites se han visto modificados por la acción humana. Dentro del género *Pomacea*, cuatro especies fueron introducidas fuera del continente americano (Hayes et al. 2008). Es el caso de *P. canaliculata* (Lamarck, 1822), *P. maculata* (Perry, 1810), *P. scalaris* (d'Orbigny, 1835) y *P. diffusa* (Blume, 1957). La primera, cuya distribución nativa comprende la cuenca del Río de La Plata, está catalogada dentro de las 100 peores plagas a nivel mundial (Lowe et al. 2000) (Fig. 1.1).

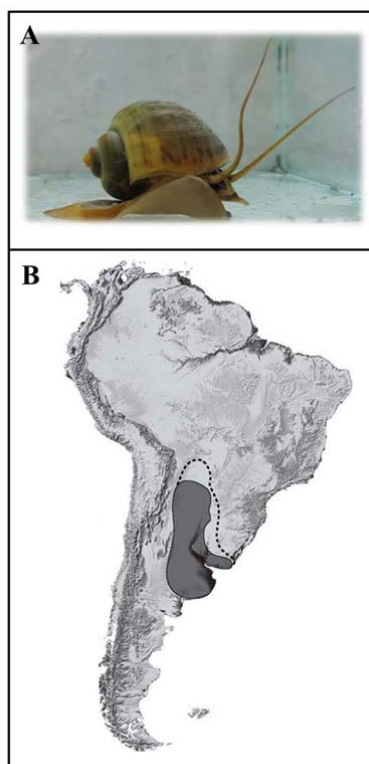


Figura 1.1. *Pomacea canaliculata*. **A)** Individuo adulto. **B)** Distribución nativa. Las áreas sombreadas representan rangos de distribución determinados por sitios de muestreo y la línea punteada representa el rango inferido en base a registros publicados y similitud de hábitats (tomado de Hayes et. al. (2012)).

La invasión de *P. canaliculata*, en muchos casos se ha visto asociada a impactos económicos, sanitarios y ecológicos. Como plaga de la agricultura ha generado graves pérdidas económicas que afectan principalmente cultivos de arroz en el sudeste asiático, y de taro en Hawái y otras islas del Océano Pacífico (Cowie 2002). Por otro lado, como hospedador intermediario del nematodo *Angiostrongilus cantonensis*, su dispersión en el sudeste asiático se ha visto asociada con la expansión de angiostrongiliasis (Lv et al. 2009), una enfermedad potencialmente fatal en humanos, donde desarrolla una meningoencefalitis. La presencia del parásito, así como el registro de casos de angiostrongiliasis en el continente americano fueron detectados por primera vez en Cuba en el año 1981, y más recientemente en Ecuador y Brasil (Caldeira et al. 2007, Dorta-Contreras & Reiber 2004, Slom & Johnson 2003). Con respecto a las consecuencias ecológicas, más difíciles de mensurar, su invasión ha mostrado un impacto en los ecosistemas nativos. En particular se han observado casos de cambios en el funcionamiento de los ecosistemas de agua dulce, de aquellos de aguas claras

dominados por macrófitas a ecosistemas dominados por algas planctónicas y aguas turbias (Carlsson et al. 2004).

Por el impacto antes mencionado no es sorprendente que dentro de la familia Ampullariidae sea sobre *P. canaliculata* que se haya concentrado la mayor parte de las investigaciones. Más allá de la importancia que ha adquirido esta especie fuera del ámbito académico, que representa una demanda de conocimiento en busca de soluciones para los problemas antes mencionados, también se destaca como un potencial organismo modelo, contando con información referida a su morfología, ecología, comportamiento, reproducción, desarrollo, alimentación, entre otros (Hayes et al. 2015). La misma información preexistente permite abordar aspectos complejos de su biología a distintos niveles, desde el molecular hasta el ecológico, siendo a su vez una especie relativamente fácil de criar. Por otro lado, a nivel regional, se trata de una especie característica de nuestra región, siendo el gasterópodo más conspicuo en los cuerpos de agua lénticos de la llanura pampeana (Martín et al. 2001).

1.2. Biología reproductiva

Distintos aspectos de la biología de *P. canaliculata*, como su reproducción, crecimiento y supervivencia, muestran una gran plasticidad, siendo fuertemente influenciados por factores ambientales (Estebenet & Martín 2002). En zonas con clima sin estacionalidad marcada, los individuos se mantienen activos durante todo el año, mientras en las regiones templadas, como en Argentina, atraviesan por un período de actividad reducida condicionado por las bajas temperaturas. Esto determina que en este último caso, los individuos atraviesen por distintas temporadas reproductivas que en nuestra zona se corresponden con los meses de octubre a marzo aproximadamente (Estebenet & Martín 2002, Seuffert et al. 2010).

La biología reproductiva en los ampuláridos ha recibido especial atención, siendo un aspecto clave para el entendimiento de los patrones de distribución, la invasividad y probablemente la evolución de los hábitos anfibios dentro de la familia (Hayes et al. 2015). En la mayoría de los gasterópodos (incluyendo los ampuláridos), y a diferencia del resto de los invertebrados, los huevos contienen relativamente poca cantidad de vitelo, y en su lugar los oocitos fecundados están rodeados de un fluido nutricio, denominado fluido perivitelino (FPV). En este caso, el vitelo está reducido a gránulos proteicos no nutritivos. El FPV es incorporado por pinocitosis y las vesículas

resultantes se fusionan con lisosomas primarios que contienen las enzimas hidrolíticas para su digestión. (De Jong-Brink et al. 1983). Las hembras de *P. canaliculata* producen masas de huevos de un intenso color rosado (Fig. 1.2) cuyo FPV ha sido extensamente estudiado desde una perspectiva bioquímica. Está compuesto principalmente por galactógeno en vez de glucógeno (polisacárido cuyo monómero es la galactosa) y proteínas, denominadas perivitelinas (Garín et al. 1996, Heras et al. 1998) que han sido el foco de múltiples estudios centrados en su rol durante el desarrollo embrionario adicionalmente a la nutrición. Las perivitelinas más abundantes del FPV son PcOvo y PcPV2, que representan el 58,2% y 9,8% de las proteínas totales del huevo, respectivamente (Dreon et al. 2003, Dreon et al. 2002). PcOvo, antiguamente llamada ovorrubina o PV1, es una proteína oligomérica compuesta por subunidades de entre 28 y 35 kDa (Garín et al. 1996) que une, no covalentemente, y estabiliza el carotenoide astaxantina, dotando a los embriones de un potente antioxidante de membrana (Dreon et al. 2004a). Además, dada su abundancia y la presencia de un pigmento carotenoide, PcOvo es también la responsable de la coloración rojiza de los huevos (Fig. 1.2), la cual funcionaría como una señal de advertencia (aposemática) para potenciales depredadores (Heras et al. 2007). Esta perivitelina es capaz de resistir la digestión gastrointestinal simulada *in vitro* y llegar en su conformación nativa al intestino delgado de un depredador, por lo cual es considerada como antinutritiva (Dreon et al. 2010). La perivitelina PcPV2, además de ser también resistente a la digestión, presenta una potente actividad neurotóxica con un efecto letal demostrado en ratones. Esta toxina presenta una estructura única en la naturaleza, que combina una subunidad lectina (31 kDa) y una subunidad formadora de poros (67 kDa) unidas por puentes disulfuro (Dreon et al. 2013, Frassa et al. 2010, Heras et al. 2008). De este modo, el FPV en *P. canaliculata* no sólo aporta energía y nutrientes durante el desarrollo embrionario, función análoga a la del vitelo de otros animales, sino que también cumple un rol en la protección o defensa de los embriones frente a factores bióticos y abióticos del ambiente.



Figura 1.2. Puestas de *P. canaliculata*. Fotografías de la localidad de San Pedro, Provincia de Buenos Aires.

Las especies del género *Pomacea* depositan sus huevos fuera del agua, a diferencia del resto de los integrantes de la familia que desovan en el agua o en la interfase agua-aire (Hayes et al. 2009a). El pasaje a la oviposición aérea probablemente haya requerido del desarrollo de adaptaciones particulares dadas las distintas propiedades físicas del medio terrestre, más fluctuante y hostil frente a la radiación solar, la temperatura y la desecación. A su vez, con su paso al medio terrestre, los huevos quedan expuestos a una nueva serie de depredadores. En el caso de los huevos de *P. canaliculata*, éstos prácticamente no sufren depredación siendo el único depredador reportado la hormiga de fuego *Solenopsis geminata* (Yusa 2001). Esto último probablemente esté vinculado con la presencia de las perivitelinas defensivas asociada a una señal aposemática como advertencia para los posibles depredadores (Heras et al. 2007). De este modo, las perivitelinas PcOvo y PcPV2 son consideradas como adquisiciones evolutivas clave, probablemente asociadas a la oviposición aérea y se piensa que podrían haber contribuido al éxito del género. En relación con esta hipótesis, de acuerdo con los estudios sobre las perivitelinas homólogas a PcOvo y PcPV2 en otras especies del género (*Pomacea maculata* y *Pomacea scalaris*), éstas han demostrado tener características estructurales y funcionales semejantes a las de *P. canaliculata* (Giglio et al. 2016, Ituarte et al. 2008, Pasquevich et al. 2014).

Con respecto a la alta fecundidad que exhibe la especie, se ha determinado que las hembras de *P. canaliculata* son capaces de depositar de 1.300 a 11.000 huevos

durante toda su vida en condiciones de laboratorio (Martín & Estebenet 2002). El tracto reproductor femenino presenta un órgano reproductivo especializado: el complejo glándula del albumen- glándula de la cápsula, comúnmente denominado como "glándula del albumen", término que se adoptará en el presente trabajo, abreviándolo como "GA". La GA se destaca no sólo por su coloración, semejante a la de los huevos, sino también por su contribución en biomasa a la masa visceral de las hembras (Fig. 1.3). Se trata de una glándula sexual accesoria del tracto reproductor femenino responsable de importantes funciones vinculadas con la producción de huevos tales como la perivitelogénesis (síntesis del FPV), la secreción del FPV y la formación de la cápsula calcárea que rodea a los huevos (Catalán et al. 2002, Ruhnán 1988).

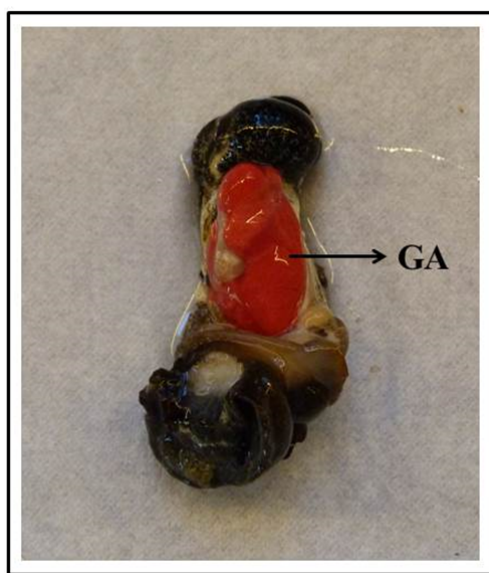


Figura 1.3. Glándula del albumen de *P. canaliculata*. Fotografía de las partes blandas de una hembra.

Recientes estudios transcryptómicos y proteómicos evidencian una gran inversión materna en proteínas del FPV (Sun et al. 2012a), y en el caso de las perivitelininas PcOvo y PcPV2, se ha demostrado que su síntesis ocurre de manera exclusiva en la GA donde son almacenadas hasta el momento de la oviposición (Catalán et al. 2006, Dreon et al. 2003, Dreon et al. 2002, Sun et al. 2012b). La GA es una estructura ovoide, frecuentemente de coloración llamativa, que está formada por un parénquima que incluye en su interior al ducto glandular de la cáscara, el ducto glandular del albumen, un receptáculo seminal y una bursa copulatrix (Fig. 1.4). El oviducto está constituido por tres segmentos: el ovario, un segmento renal y uno paleal, siendo este último quien

da origen a la GA y se conecta con el exterior mediante el segmento extraparenquimal del ducto glandular de la cáscara (Catalán et al. 2006, Catalán et al. 2002). Además de ser el órgano encargado de la perivitelogénesis, y de la síntesis de la cubierta calcárea del huevo, la GA centraliza otras funciones importantes vinculadas con la reproducción. Así, almacena el esperma y recibe los oocitos desde el ovario en el receptáculo seminal, donde también ocurre la fecundación (Catalán et al. 2002, Giraud-Billoud et al. 2012). A su vez, este órgano almacena y mantiene viables los espermatozoides de distintos machos siendo las hembras capaces de depositar huevos fértiles hasta 140 días desde la última inseminación (Estebenet & Cazzaniga 1993).

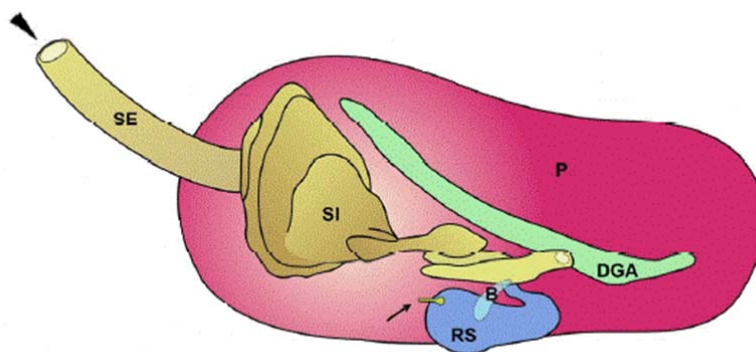


Figura 1.4. Esquema ilustrativo de la morfología y arreglo topográfico que exhiben los componentes del oviducto paleal de *P. canaliculata*. RS: receptáculo seminal. B: bursa copulatrix. P: parénquima glandular. DGA: ducto glandular del albumen. SI: segmento intraparenquimal del ducto glandular de la cáscara. SE: segmento extraparenquimal del ducto glandular de la cáscara. Cabeza de flecha: gonoporo. Flecha: oviducto renal. Tomado de la Tesis doctoral de N. M.Y. Catalán (2007).

A diferencia de sus huevos, los adultos de *P. canaliculata* cuentan con una amplia variedad de depredadores. Entre las especies más estudiadas se destacan el gavián caracolero *Rostrhamus sociabilis* (Viellot, 1817) (Fig. 1.5), el carrao *Aramus guarauna* (Linneo, 1766) y la rata noruega *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (Snyder & Kale 1983, Sykes 1987, Yusa et al. 2000). Observaciones de campo indican que dichos depredadores descartan la GA cuando se alimentan de hembras de especies del género *Pomacea* (Snyder & Kale 1983, Snyder & Snyder 1969, 1971, Sykes 1987, Yusa et al. 2000), sin embargo la razón del descarte no había sido estudiada siendo uno de los objetivos del presente trabajo (Fig. 1.5).



Figura 1.5. Gavilán caracolero y GA descartadas por este depredador. Fotografías tomadas en la localidad de San Pedro, Provincia de Buenos Aires.

2.

Objetivos

Objetivos generales:

- Contribuir al entendimiento de la perivitelogénesis en gasterópodos desde una perspectiva bioquímica, y su vínculo con el alto rendimiento reproductivo de *P. canaliculata* y con los hábitos alimenticios de los depredadores del género *Pomacea*.
- Contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de *P. canaliculata*, una especie de importancia económico-sanitaria, característica de la región bonaerense y representante sobresaliente de un grupo de gasterópodos dulceacuícolas.

A continuación se presentan los **objetivos específicos**, cuyo marco teórico será desarrollado en las secciones correspondientes:

- 1) Determinar si los precursores de las perivitelinas PcOvo y PcPV2 almacenadas en la GA presentan diferencias estructurales y de actividad biológica respecto a las incorporadas al huevo (sección 3).
- 2) Determinar la composición bioquímica de la GA de *P. canaliculata* así como su contenido energético (sección 4).
- 3) Analizar si existen diferencias entre machos y hembras de *P. canaliculata* en la composición bioquímica y el contenido energético de los tejidos blandos consumidos por los depredadores, y determinar cuál es la energía efectivamente disponible para un depredador en función de la talla y el sexo de la presa (sección 4).
- 4) Evaluar el efecto de la actividad reproductiva de cópula y oviposición sobre los niveles de los principales componentes de secreción acumulados en la GA de *P. canaliculata* y sobre la expresión de las principales perivitelinas en el órgano (sección 5).

- 5) Cuantificar la movilización de los principales componentes de secreción hacia los huevos, y determinar si alguno de los mismos representa un factor limitante del esfuerzo reproductivo en *P. canaliculata* (sección 5).

3.

**Análisis estructural y funcional de las
perivitelinas PcOvo y PcPV2 de la
glándula del albumen**

3.1. Introducción

3.1.1. *Mecanismos vitelogénicos en animales ovíparos, singularidades de gasterópodos y Pomacea canaliculata como modelo para el estudio de la síntesis de perivitelinas*

La estructura del tracto reproductor así como los mecanismos vitelogénicos, en relación a la cantidad, calidad y tasa de incorporación de energía (vitelo) en los huevos, son rasgos fundamentales que condicionan el modo de vida de muchos metazoos (Eckelbarger 1994). Durante el proceso de vitelogénesis, las especies ovíparas sintetizan las biomoléculas (lípidos, proteínas y carbohidratos) que serán incorporadas a los oocitos primarios como reserva de energía y de materiales estructurales para sustentar el desarrollo embrionario (De Jong-Brink et al. 1983). Las proteínas mayoritarias del vitelo suelen formar partículas solubles complejas denominadas vitelinas (Wallace et al. 1967), cuyos precursores (vitelogeninas) sufren importantes cambios estructurales, incluyendo proteólisis, antes de adquirir la conformación de las vitelinas maduras (Raikhel & Sappington 2002). La síntesis de las vitelogeninas puede ocurrir tanto en el tejido ovárico (autosíntesis), como en tejidos extraováricos para ser luego transportadas e incorporadas por los oocitos (heterosíntesis) (Eckelbarger 1994). Mientras que en los vertebrados las vitelogeninas se originan sólo por heterosíntesis en el hígado, en invertebrados la vitelogénesis puede ser variable, y se han descrito tanto casos de autosíntesis (equinodermos, crustáceos, insectos y moluscos) como de heterosíntesis (nematodos, equinodermos, poliquetos, arácnidos, crustáceos e insectos). La heterosíntesis en invertebrados, está más ampliamente distribuida a través de los grupos taxonómicos y se lleva a cabo en diversos órganos somáticos tales como el intestino, celoma o cuerpo graso, entre otros (Valle 1993). Como fue mencionado en la introducción general, la mayoría de los gasterópodos han desarrollado un mecanismo particular y alternativo a la vitelogénesis que involucra la síntesis del FPV por parte de la GA. En lo referido a su función nutricia, las perivitelinas presentes en el FPV serían análogas a las vitelinas del resto de los metazoos. Sin embargo, a diferencia de estas, no se conoce si sus precursores tienen la misma conformación que la forma final incorporada al huevo, o si durante la perivitelogénesis sufren cambios estructurales semejantes al de las vitelinas antes de alcanzar su destino final. La falta de información en este aspecto es llamativa considerando el papel central que cumplen las perivitelinas en la reproducción.

Teniendo en cuenta que existe considerable información sobre la estructura y función de las perivitelinas PcOvo y PcPV2 de los huevos de *P. canaliculata*, estas representan un modelo apropiado para estudiar la síntesis de los precursores de perivitelinas de la GA de gasterópodos.

3.1.2. Precursores de perivitelinas en *Pomacea canaliculata* y su posible relación con el comportamiento de los depredadores de caracoles adultos

Como ya fue mencionado, los depredadores de adultos de *P. canaliculata* son numerosos, destacándose el gavián caracolero *Rostrhamus sociabilis*, el carrao *Aramus guarauna* y la rata noruega *Rattus norvegicus* (Snyder & Kale 1983, Sykes 1987, Yusa et al. 2000). Con respecto a sus hábitos alimenticios, el caracolero y el carrao son cazadores diurnos que concentran su búsqueda de alimento en cuerpos de agua lénticos. Una vez capturado el caracol lo trasladan a una percha o a la orilla, respectivamente, para consumir las partes blandas (Tanaka et al. 2006). El caso del caracolero es particularmente interesante ya que se trata de un depredador especialista que se alimenta prácticamente de manera exclusiva de caracoles del género *Pomacea*. Detecta a la presa visualmente sobrevolando los cuerpos de agua, y su pico y sus garras están altamente especializadas, extrayendo las partes blandas del caracol sin dañar la conchilla, las cuales se acumulan típicamente en pilas debajo de las perchas que eligen para posarse al alimentarse (Bourne 1993, Snyder & Kale 1983, Sykes 1987). El carrao, por el contrario, hace un orificio en la conchilla para desprender al caracol de la misma, y las ratas eliminan la conchilla con sus dientes hasta alcanzar la zona de inserción del músculo columelar (Yusa et al. 2000). Más allá de estas diferencias en el modo de alimentación, estos tres depredadores descartan la GA cuando se alimentan de hembras de *Pomacea* (Snyder & Kale 1983, Snyder & Snyder 1969, 1971, Sykes 1987, Yusa et al. 2000). Considerando el papel de la GA en las síntesis y almacenamiento del FPV, el descarte de la GA podría considerarse un indicio de que las perivitelinas, en particular PcOvo y PcPV2, podrían encontrarse ya funcionalmente activas en el órgano, resultando antinutritivo, antidigestivo y neurotóxico para los depredadores.

3.2. Objetivos e hipótesis

- 1) Determinar si las perivitelinas PcOvo y PcPV2 almacenadas en la GA presentan diferencias estructurales respecto a las incorporadas al huevo.
- 2) Determinar si las perivitelinas PcOvo y PcPV2 almacenadas en la GA presentan la misma actividad biológica descrita para las mismas en los huevos de la especie.

Con estos objetivos se busca aportar la primera información en gasterópodos sobre la síntesis de perivitelinas en la GA en lo referido a la relación estructura y actividad biológica de sus precursores. Hipotetizamos que, a diferencia de las vitelogeninas de los demás invertebrados, las perivitelinas de estos gasterópodos no sufren un procesamiento antes de ser incorporadas a los huevos, y que por lo tanto se almacenan en la GA ya en su forma funcional. El empleo de *P. canaliculata* como modelo para evaluar esta hipótesis permitiría al mismo tiempo abordar a nivel molecular las causas del llamativo comportamiento de descarte de la GA exhibido por los depredadores de hembras adultas de *Pomacea*. En este sentido, hipotetizamos que el órgano resultaría nocivo para los mismos.

3.3. Metodología

3.3.1. Material biológico

Hembras adultas y huevos de *P. canaliculata* fueron recolectados del cuerpo de agua artificial del paseo del bosque de la Ciudad de La Plata (34°54'38"S 57°56'17"O) durante el período reproductivo (noviembre-marzo). Se recolectaron sólo puestas depositadas recientemente, fácilmente identificables gracias al aspecto fresco de la mucosidad que rodea externamente los huevos, y que corresponden al estadio de mórula (Heras et al. 1998). Las hembras utilizadas fueron obtenidas de parejas en cópula. La GA disecada de estos individuos y las masas de huevos fueron preservadas a -80°C hasta su procesamiento.

3.3.2. *Preparación de la fracción soluble conteniendo perivitelinas*

Las muestras de GA y huevos (cada muestra compuesta por un mínimo de 3 GA/puestas en cada caso) fueron homogeneizadas con buffer Tris 20 mM HCl pH 7,4 (relación buffer-muestra 3:1 v/p) en frío y utilizando un homogeneizador tipo Potter. El homogenato fue centrifugado 20 min a 10.000 g para precipitar núcleos, mitocondrias, lisosomas y peroxisomas. El sobrenadante fue posteriormente centrifugado 50 min a 100.000 g para sedimentar la membrana plasmática y la fracción microsomal (Lodish et al. 2005). El sobrenadante de este segundo paso (fracción soluble), conteniendo los componentes solubles del material de partida, fue reservado a -70°C hasta su análisis.

3.3.3. *Purificación de PcOvo y PcPV2*

Se ultracentrifugó la fracción soluble de huevo y GA en un gradiente de NaBr, durante 22 h a 207.000 g, lo cual separa las partículas solubles de la muestra en función de su densidad. Las fracciones del gradiente conteniendo las distintas perivitelinas fueron desaladas y concentradas mediante ultrafiltración (Amicon Ultra-4 Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). La purificación final se realizó combinando cromatografía líquida de exclusión molecular y de intercambio iónico como se describe más adelante en las secciones 3.3.5 y 3.3.6. La identidad de las perivitelinas en las fracciones obtenidas, así como su grado de pureza, se determinó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas.

3.3.4. *Electroforesis en gel de poliacrilamida*

Las muestras conteniendo las perivitelinas PcOvo y PcPV2 de huevo y de GA fueron analizadas en geles de poliacrilamida (gradientes de 4-10% y 4-12% respectivamente) tanto en condiciones nativas, donde las proteínas migran en función de su relación carga/masa, como disociantes, donde su movilidad queda determinada únicamente por su masa. En busca de obtener la mejor resolución, se sembraron entre 2 y 3 µg de proteína y alrededor de 5 µg para geles en condiciones nativas y disociantes, respectivamente. Se sometieron a un voltaje de 120 V (Bio-Rad Mini Protean 3 System) hasta que éstas migraran hasta su poro límite, o bien hasta que el frente de corrida llegara a la base del gel, respectivamente. Se sembró una mezcla de proteínas estándar

(GE Amersham) para poder determinar el peso molecular de las perivitelininas. Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie (Sigma Aldrich).

3.3.5. *Cromatografía líquida de intercambio aniónico*

La cromatografía de intercambio iónico separa moléculas en función de su carga al quedar retenidas en una fase estacionaria cargada negativa o positivamente. En la cromatografía de intercambio aniónico la fase estacionaria está cargada positivamente y las proteínas se encuentran en un buffer con pH básico, de modo que su carga neta es negativa y quedan retenidas en distinto grado en función de sus cargas eluyendo de la columna a distintos tiempos.

Esta técnica se utilizó con fines tanto preparativos, para la purificación de las perivitelininas, como con fines analíticos, para comparar los tiempos de retención de las perivitelininas en función de su origen. En ambos casos se utilizó una columna Mono Q 10/100 GL (GE Health Care Bio-sciences AB) acoplada a un equipo de HPLC (Agilent 1260). La fase móvil estuvo constituida por buffer Tris HCl 20 mM pH 8,5 con un gradiente de NaCl. Los cromatogramas se obtuvieron registrando la absorbancia del eluyente a 280 nm en función del tiempo. Se determinaron los tiempos de retención de las distintas perivitelininas.

3.3.6. *Cromatografía líquida de exclusión molecular*

La cromatografía de exclusión molecular separa proteínas en función su volumen hidrodinámico, volumen que ocupan las proteínas en solución.

Así como en el caso de la cromatografía de intercambio iónico, esta metodología fue empleada con fines tanto preparativos como analíticos. Se utilizó una columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300 GL (GE Health Care Bio-sciences AB) acoplada a un equipo de HPLC (Agilent 1260) y la fase móvil estuvo compuesta por buffer Tris 20 mM HCl pH 8,5. Del mismo modo que en el caso anterior, los cromatogramas se obtuvieron registrando la absorbancia del eluyente a 280 nm en función del tiempo. Se determinaron los tiempos de retención de las distintas perivitelininas.

3.3.7. Cuantificación de proteínas mediante espectrofotometría

Para la determinación de la concentración de proteína presente en las muestras purificadas y en la fracción soluble, se utilizó la metodología descrita en Lowry et al. (1951). Este método colorimétrico propicia la formación de un complejo entre los enlaces peptídicos e iones Cu^{+2} que reacciona con el reactivo de Folin-Ciocalteu y genera un producto coloreado que absorbe a 750 nm. Para establecer la concentración de la muestra incógnita se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) como proteína estándar, en un rango de entre 0,025 y 0,225 mg/mL. Tanto en el caso de las muestras como en el caso de la curva estándar, las mediciones se hicieron por triplicado. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible (Agilent Technologies, Inc.).

3.3.8. Espectroscopía de dicroísmo circular

La técnica de dicroísmo circular (CD) se basa en la exposición de una muestra a un haz de luz linealmente polarizado formado por una componente circularmente polarizada dextrógira y otra levógira, y el posterior registro de la diferencia de absorción de una y otra componente. Tal diferencia de absorción se da ante la presencia de asimetría en el sistema, es así que resulta útil para estudiar moléculas quirales o aquellas que por algún motivo adoptan una conformación invariable. El espectro de CD en el UV lejano proporciona en el caso de las proteínas información acerca del tipo y contenido de estructura secundaria de alfa-hélice o lámina beta.

Se registraron los espectros de CD en el UV lejano (195-250 nm) para muestras de ambas perivitelinas aisladas tanto de huevo como de GA en el servicio que ofrece el Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas “Prof. Alejandro C. Paladini” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente en un espectropolarímetro Jasco J-810. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico, sensibilidad estándar, velocidad de barrido de 20 nm/min y constante de tiempo de 1 s. Las proteínas se analizaron a 0,5 mg/mL en buffer Tris HCl 20mM pH 8,5. Los espectros fueron corregidos por la contribución del buffer.

3.3.9. Espectroscopía de fluorescencia

El espectro de emisión de fluorescencia de una proteína está dominado por la fluorescencia del triptófano (Trp). Este aminoácido normalmente se encuentra en las regiones hidrofóbicas de una proteína. Un cambio en la estructura de una proteína tiene como consecuencia un cambio en el entorno electrónico del Trp, modificándose el espectro de fluorescencia intrínseca de la proteína.

Los espectros de fluorescencia de soluciones de PcOvo y PcPV2 de ambos orígenes en buffer Tris 20 mM HCl pH 8,5 fueron adquiridos en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS55 (Norwalk, CT, USA), a 25°C y se empleó una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La longitud de onda de excitación fue de 285 nm (Slits 8 mm) y la emisión fue registrada entre 295 y 440 nm (Slits 8mm). Las diferencias en el máximo de emisión fueron evaluadas estadísticamente mediante test de t a dos colas con un intervalo de confianza del 95%, usando el software Graphpad InStat v.3.05.

Para evaluar la estabilidad estructural de las perivitelinas de GA frente a distintas condiciones de pH, se utilizaron soluciones de PcOvo y PcPV2 en agua Ultrapura, las cuales fueron incubadas durante toda la noche en una serie de buffers con un rango de pH de entre 2,0 y 12,0 a una concentración final de 0,23 mg/mL y 0,26 mg/mL, respectivamente. La composición de los buffers utilizados fue la siguiente:

Buffer pH 2,0: PO_4H_3 0,1M / $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ 0,1M

Buffer pH 4,0: ácido cítrico 0,1M / $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ 0,1M

Buffer pH 6,0: $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ 0,1M / NaOH

Buffer pH 8,0: $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ 0,1M / NaOH

Buffer pH 10,0: $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 0,1M/ NaOH

Buffer pH 12,0: $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 0,1M/ NaOH

En todos los casos, se adquirieron 10 espectros que fueron promediados y corregidos por la contribución del buffer correspondiente. Se compararon la longitud de onda de los máximos de emisión, la intensidad de emisión y el centro de masa de los espectros. Éste último es un valor adimensional que fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{CM} = \text{Sumatoria } (I_{(\text{long de onda})} \cdot \text{Long de onda}) / \text{sumatoria de intensidades}$$

Donde CM es el centro de masa e I es el valor de absorbancia en unidades arbitrarias

3.3.10. *Espectroscopía de absorción*

El espectro de absorción en la región UV puede ser útil como herramienta para evaluar la estructura de las proteínas ya que las propiedades espectroscópicas de los aminoácidos aromáticos se afectan por su entorno fisicoquímico. Las proteínas pueden presentar absorción por encima de los 400 nm sólo en caso de poseer grupos prostéticos que absorban la radiación en la región visible, como es el caso de la carotenoproteína PcOvo.

Se tomaron los espectros de absorción en la región UV-visible de soluciones de PcOvo y PcPV2 de alrededor de 0,5 mg/mL aisladas de huevo y GA en buffer Tris 20 mM HCl pH 8,5. Las mediciones se realizaron a 25°C en un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible (Agilent Technologies, Inc.). Con el objeto de detectar pequeños cambios en la estructura de las proteínas, se analizó la cuarta derivada de los espectros en la región UV. A su vez se tomaron los espectros de absorción de las muestras de PcOvo aislada de la GA y preincubadas a distintos pH como se detalló en el apartado anterior, con el objetivo de evaluar el efecto del pH sobre la fracción carotenóide de la perivitelina. En todos los casos, las muestras fueron medidas en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico y cada espectro fue el resultado de un promedio de 10 mediciones independientes. Los datos fueron corregidos por su respectivo blanco y por el efecto de la dispersión de luz.

3.3.11. *Dispersión de rayos X a bajo ángulo*

La dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS por sus siglas en Inglés) de las proteínas en solución brinda información de su forma y su tamaño. Con esta herramienta se pueden obtener modelos tridimensionales de baja resolución de las partículas en solución.

Debido a que esta técnica está poco desarrollada en nuestro país, se detallan a continuación los fundamentos de la misma. En líneas generales, cuando un haz de rayos X incide sobre una solución de partículas monodispersa, parte de los rayos dispersados al chocar contra las partículas inciden sobre un detector. Los datos que se obtienen

corresponden a intensidad en función del ángulo de dispersión. Este último es convertido a valores de q (momento de transferencia) a partir de la siguiente relación:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta$$

A bajo ángulo, la dispersión que se registra depende de la interacción de los rayos X con la superficie de las partículas, y por lo tanto este parámetro contiene información estructural vinculada con el tamaño y la forma de las mismas. Dentro de la serie de datos registrados pueden distinguirse dos regiones, la región de Guinier (a bajo q) y la región de Porod (a mayor valor de q). Dentro de la región de Guinier se cumple la siguiente relación:

$$\ln I = \ln I_0 - q^2 \left(\frac{R_g^2}{3} \right)$$

Aplicando esta fórmula a los datos dentro de la región de Guinier puede calcularse el radio de giro de la partícula (R_g), un parámetro que representa el promedio de las distancias de cada átomo de la partícula al centro de masa de la misma. Los datos contenidos en la región de Porod se relacionan con la superficie y el volumen de la partícula.

Graficando el total de los datos como $I(q) \cdot q^2$ en función de q se obtiene el grado de globularidad de la partícula (gráfico de Kratky). Es posible también calcular la distribución de pares de distancias para la partícula ($P(r)$) y estimar así su forma global. Finalmente, a partir de la distribución de pares de distancias obtenida se puede realizar un modelado de baja resolución de la estructura tridimensional de la partícula empleando distintos algoritmos de cálculo tales como Gasbor, Dammin y Dammif.

Las mediciones de SAXS se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron, Campinas (San Pablo, Brasil) en la línea D02A-SAXS2. El patrón de dispersión fue registrado mediante un detector bidimensional tipo MARCCD usando el software libre FIT 2D (<http://www.esrf.fr/computing/scientific/FIT2D>). Se utilizaron celdas de mica con 1mm de camino óptico y con un volumen libre de 300 μ l para la muestra. La longitud de onda aplicada fue de 1,55 Å y el rango nominal de q fue entre 0,09 y 2,2 nm. Todas las mediciones fueron hechas a 25°C, y se promediaron al menos 5 curvas independientes, corregidas por la intensidad del haz, la homogeneidad del

detector y la absorción de la muestra. Las determinaciones fueron llevadas a cabo dentro de un rango de concentración de proteína de 2,40 – 0,50 mg/mL. El tamaño de las perivitelinas aisladas de GA fue determinado usando el RG, y su globularidad fue evaluada a través de gráficos de Kratky. La distribución de pares de distancias fue calculada utilizando la transformación de Fourier con el software GENOM (Svergun 1992). Utilizando el algoritmo de alineamiento simulado disponible en el programa DAMMIF (Svergun 1999), se obtuvo un modelo tridimensional de baja resolución. El análisis de los datos de SAXS fue llevado a cabo a través del software ATSAS 2.7.1 (Petoukhov et al. 2012). Las diferencias en la longitud de los ejes mayor y menor de las partículas así como en su radio de giro fueron evaluadas estadísticamente mediante test de t a dos colas con un intervalo de confianza del 95%, usando el software Graphpad Instat v.3.05.

3.3.12. *Proteólisis parcial con proteinasa K*

Se llevó a cabo una digestión limitada de las perivitelinas nativas aisladas de huevo y GA con proteinasa K. Esta proteasa es capaz de hidrolizar de manera inespecífica enlaces peptídicos de proteínas en su conformación nativa, lo cual permitió evaluar si las perivitelinas presentan diferencias en su estructura nativa, o si por el contrario sus sitios de proteólisis son igualmente asequibles para la proteasa.

Para este ensayo se prepararon soluciones de perivitelinas en buffer Tris 20 mM HCl pH 8,5, 25 mM CaCl₂ (concentración final 1mg/mL) que se incubaron con proteinasa K Promega Corporation (concentración final 10 mg/mL) a 37°C. Se tomaron alícuotas de esta incubación a 10, 20 y 40 min, deteniendo la actividad enzimática mediante el agregado de buffer muestra para electroforesis conteniendo SDS y β-mercaptoetanol, y posteriormente hirviendo la mezcla durante 5 min. Estas muestras fueron analizadas por SDS-PAGE como se describe en la sección 3.3.4.

3.3.13. *Digestión gastrointestinal simulada*

Se llevó a cabo una digestión simulada *in vitro* emulando las condiciones físico-químicas propias del tracto gastrointestinal de un vertebrado. Este ensayo se realizó con la fracción soluble de la GA y con las perivitelinas PcOvo y PcPV2 purificadas de este órgano. Se aplicó la metodología descrita por (Moreno et al. 2005) con algunas

modificaciones que se describen a continuación. Para la digestión gástrica *in vitro* se incubaron las muestras a 37°C por 120 min a un pH de 2,5 en presencia de pepsina porcina (Sigma Aldrich) en una relación enzima: sustrato 1:20 (p/p). Se tomaron alícuotas del producto de la digestión a 0, 60 y 120 min que fueron analizadas por SDS-PAGE. Para la digestión duodenal *in vitro*, el producto de la digestión gástrica de 120 min fue utilizado como material de partida, subiendo su pH a 8,5 con NaOH 0,1 M y buffer Tris/HCl 150 mM para detener la actividad de la pepsina y proporcionar las condiciones apropiadas para la actividad de las subsiguientes enzimas digestivas. A esta mezcla se agregó a su vez ácido taurocólico 0,25 M y tripsina pancreática bovina (Sigma Aldrich) en una relación enzima: sustrato 1:2,7 (p/p) y fue incubada a 37°C. Se tomaron alícuotas a 0, 60 y 120 min para su análisis por SDS-PAGE. Se utilizó albúmina como control positivo (con enzima) y negativo (sin enzima) tanto para la fase gástrica como para la duodenal. Un resumen gráfico de la metodología descrita se presenta en la figura 3.1.

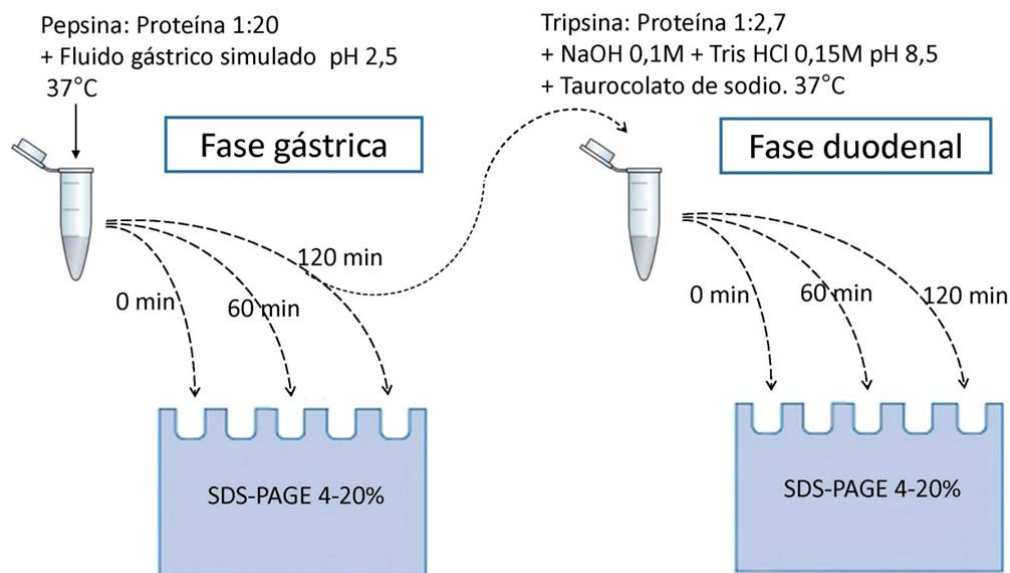


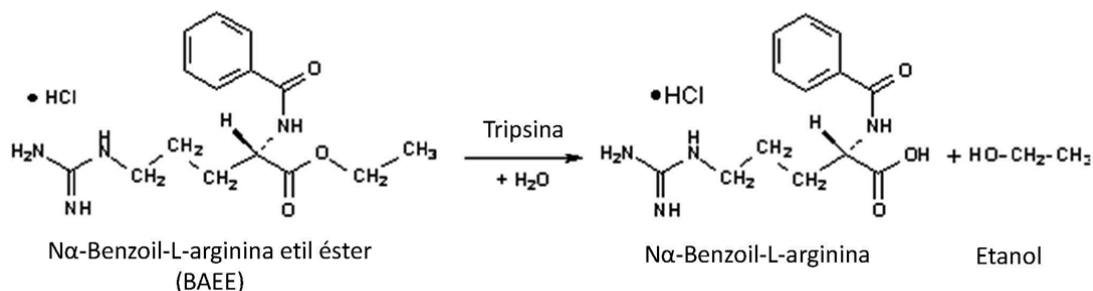
Figura 3.1. Resumen del protocolo de digestión gastrointestinal simulada *in vitro*.

3.3.14. Ensayo de inhibición de tripsina

La tripsina, una serín proteasa muy conservada en el sistema digestivo de vertebrados e invertebrados, es clave en el proceso digestivo catalizando la conversión

de más tripsinógeno en tripsina y la conversión de los zimógenos de quimotripsina, carboxipeptidasa y elastasa en sus formas activas.

Con el objetivo de determinar si la GA presenta algún componente con actividad inhibidora de tripsina, se llevó adelante un ensayo de inhibición de esta enzima con la fracción soluble preparada con este órgano. Se utilizó como sustrato el BAEE que al ser hidrolizado por la tripsina origina un producto con un máximo de absorción a 253 nm.



(Imagen editada de la página de Sigma-Aldrich)

Se midió la actividad de la tripsina sin inhibidor y en presencia de la fracción soluble de la GA. Se incubaron tres muestras de fracción soluble de GA conteniendo 79 µg de proteínas totales con 4 µg de tripsina, a 37°C, durante 5 min. Estas tres muestras fueron preparadas a partir de 3 GA cada una, como se detalló en la sección 3.3.2. A la solución de enzima preincubada con la fracción soluble se agregó BAEE y se realizó el análisis cinético de la actividad enzimática espectrofotométricamente. La Abs 253 nm fue medida durante 5 min en un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible (Agilent Technologies, Inc.). Los datos de absorbancia en función del tiempo se ajustaron a una recta a partir de cuya pendiente pueden calcularse las unidades de actividad enzimática. La unidad de actividad enzimática (UE) es un parámetro que representa la cantidad de enzima que causa un incremento de absorbancia de 0,003/min en las condiciones de medida. La actividad específica (AEE) se calcula entonces como:

$$\text{AEE (UE/mg de material)} = ((\text{Abs 253nm/min}) \times \text{factor de dil de la tripsina}) / (0,003 \times 0,2 \times \text{mg enzima/mL}).$$

Donde 0,2 es el volumen de la muestra en mL y 0,003 es el coeficiente de extinción molar del producto coloreado.

Un resumen gráfico del procedimiento se presenta en la figura 3.2.

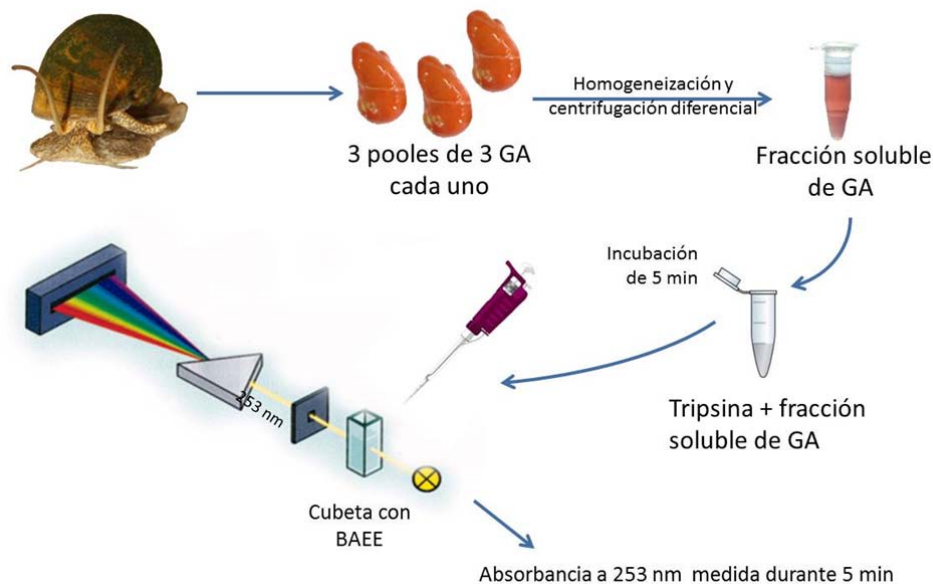


Figura 3.2. Resumen del protocolo de medición de actividad de tripsina preincubada con fracción soluble de GA.

Posteriormente se evaluó si la capacidad inhibitoria de tripsina del o los componentes de la fracción soluble se ve modificada luego de su paso por un sistema gástrico *in vitro* siguiendo la metodología descrita en la sección 3.3.13 y midiendo posteriormente la actividad de la tripsina con la metodología descrita en esta misma sección. Se midió al mismo tiempo la actividad de la tripsina frente a la fracción soluble de GA sin tratamiento previo como comparación, además de un control sin inhibidor como se describió en el ensayo general. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado y se compararon las pendientes obtenidas mediante un test de t a dos colas con un intervalo de confianza del 95% usando el software Graphpad Instat v.3.05.

3.3.15. Ensayo de toxicidad

El protocolo correspondiente a este ensayo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP (Protocolo No. P 01012016) y fue diseñado

de acuerdo con la (NIH 2011). Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c de 4 semanas de edad, pesando entre 19 y 21 g, criados en un ambiente libre de patógenos (SPF). Estos animales fueron provistos por el Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP). Grupos de 10 animales fueron inyectados intraperitonealmente con una única dosis de 300 μ L de buffer fosfato salino o el mismo volumen de una de cinco diluciones seriadas de la fracción soluble de la GA (0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 y 0.6 mg de proteínas totales). La dosis letal 50 (DL50) fue determinada por un test de letalidad considerando la mortalidad/supervivencia a las 96h posteriores a la administración de la dosis. La fracción soluble fue elaborada a partir de 4 GA. Para el monitoreo de los síntomas se siguió lo previamente establecido para las perivitelinas de huevo (Heras et al. 2008).

3.4. Resultados

3.4.1. Caracterización estructural de las perivitelinas

3.4.1.1. Conformación nativa, tamaño y forma

En condiciones nativas PcOvo aislada de GA no mostró diferencias en su movilidad electroforética con respecto a PcOvo aislada de huevo. Tampoco se observaron diferencias en este aspecto para PcPV2 independientemente de la fuente. La electroforesis en condiciones disociantes indica que también presentan la misma composición de subunidades (Fig. 3.3), y los resultados del análisis cromatográfico de intercambio aniónico y exclusión molecular tampoco evidencian diferencias en lo que respecta a las cargas superficiales o al volumen hidrodinámico respectivamente.

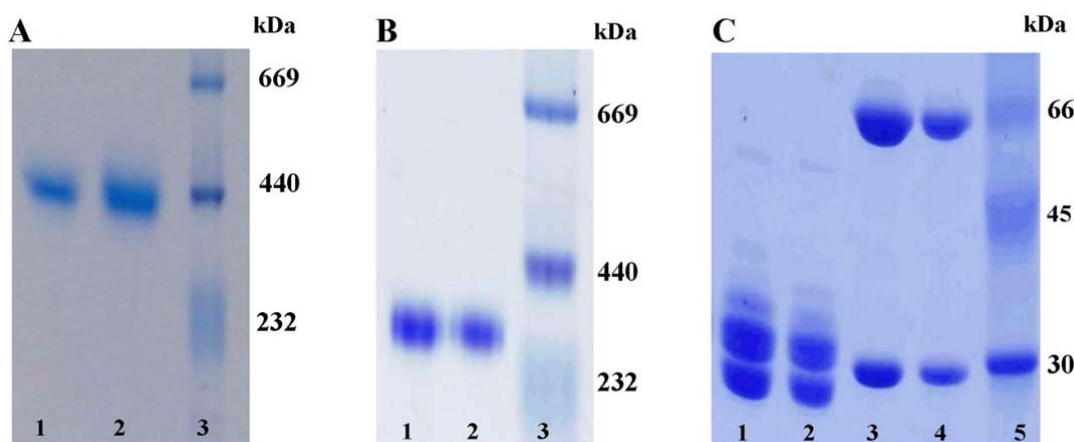
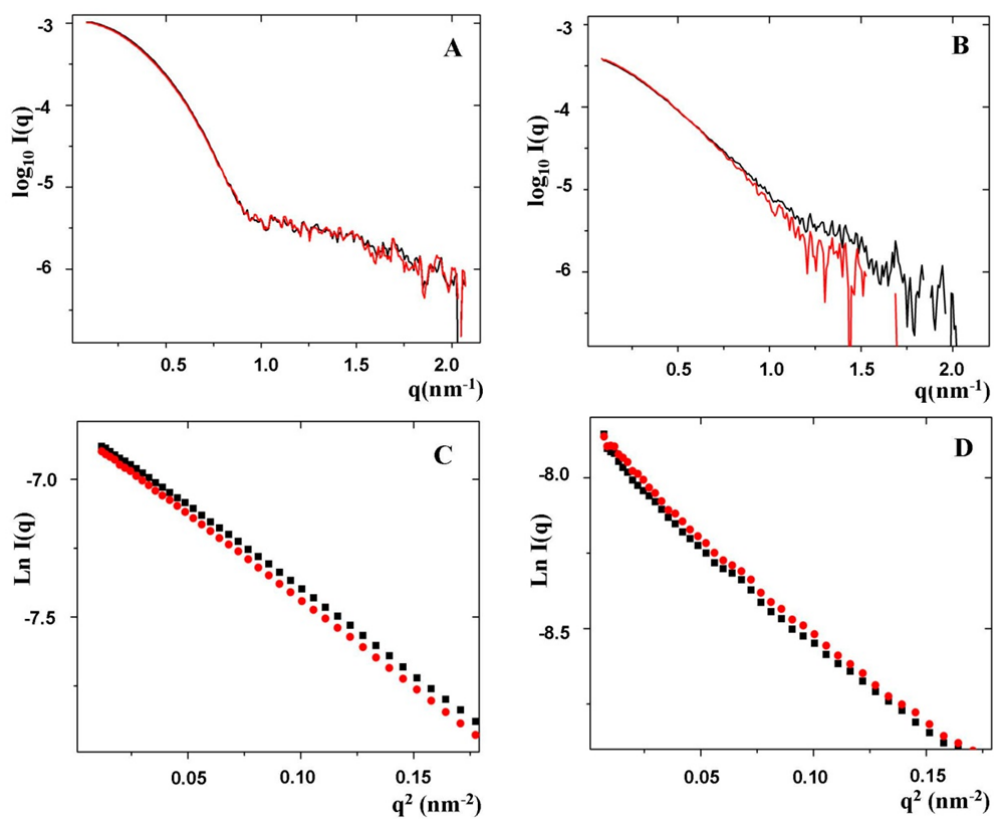


Figura 3.3. Comparación de la movilidad electroforética de las perivitelinas de huevo y GA. **A)** PAGE-nativo 4-20%. Calle 1: PcPV2 de GA; 2: PcPV2 de huevo; 3: marcadores de peso molecular. **B)** PAGE-nativo 4-20%. Calle 1: PcOvo de GA; 2: PcOvo de huevo; 3: marcadores de peso molecular. **C)** SDS-PAGE 4-20%. Calle 1: PcOvo de GA; 2: PcOvo de huevo; 3: PcPV2 de GA; 4: PcPV2 de huevo; 5: marcadores de peso molecular.

El tamaño y la forma global de PcOvo y PcPV2 aisladas de huevo y GA fueron determinados por SAXS. En los datos experimentales representados como $\lg_{10}(I(q))$ vs q para PcOvo (Fig. 3.4 A) y PcPV2 (Fig. 3.4 B), puede observarse que las curvas claramente se superponen indicando que la forma y el tamaño de las perivitelinas son semejantes independientemente de la fuente. A su vez, a partir de la linealización de los datos en la región de Guinier, fue posible calcular el radio de giro de las proteínas ($0,1 < q < 0,38 \text{ nm}^{-1}$) (Fig. 3.4 C y D). La diferencia en el radio de giro entre PcOvo de huevo y PcOvo de GA fue estadísticamente significativo, mientras que la diferencia en este parámetro entre PcPV2 de huevo y PcPV2 de GA no fue significativo (Tabla 3.1). Los gráficos de Kratky para ambas perivitelinas presentan la forma de campana característica de proteínas globulares (Fig. 3.4 E y F) y la función de distribución de pares de distancias (Fig. 3.4 G y H) indica que en ambos casos las partículas son anisométricas con un eje mayor y un eje menor bien definidos sin diferencias significativas independientemente de su origen (Tabla 3.1).

A su vez, el modelo tridimensional generado para ambas perivitelinas aisladas de la GA es similar al de aquellas aisladas de huevo y publicado por Dreon et al. (2008). Los datos de SAXS y los modelos correspondientes a las perivitelinas de GA fueron depositados en la base de acceso abierto *Small Angle Scattering Biological Data Bank*

(<http://www.sasbdb.org>) con los códigos de acceso SASDBW4 y SASDBX4 para PcOvo y PcPV2 respectivamente.



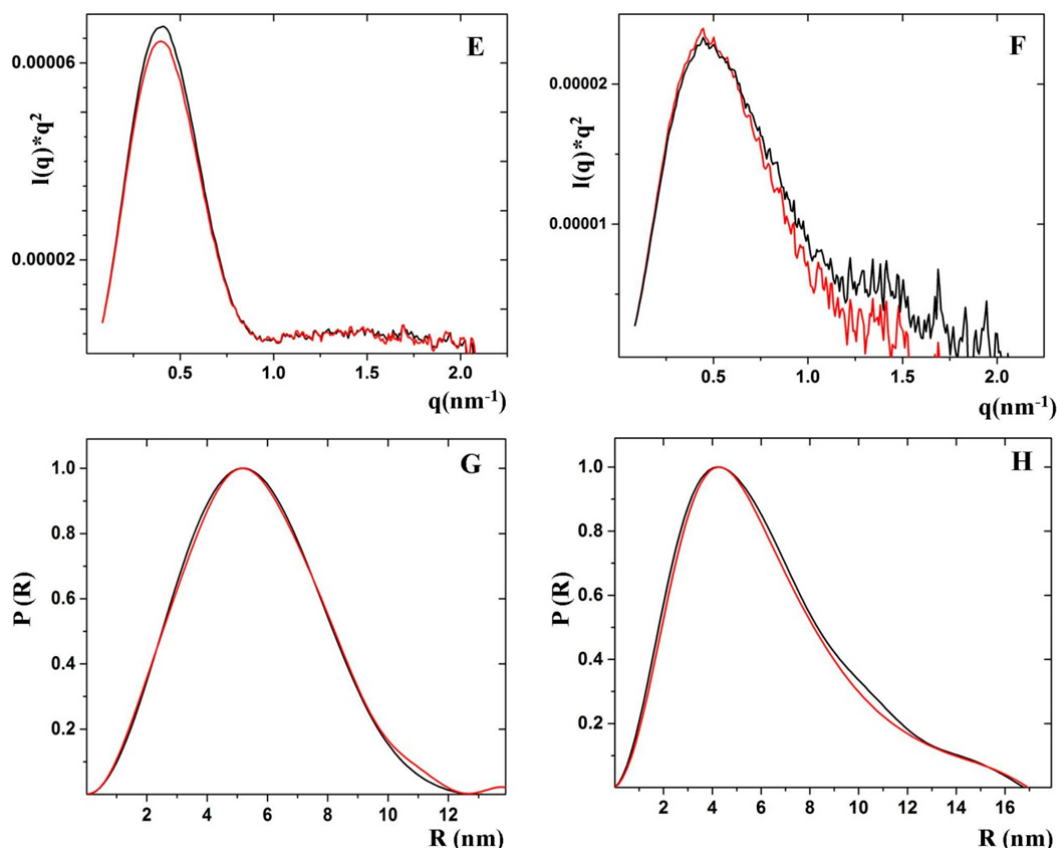


Figura 3.4. Tamaño y forma de PcOvo y PcPV2 determinados por SAXS. **A)** y **B)** datos experimentales representados como $\lg_{10}(I(q))$ vs q para PcOvo y PcPV2, respectivamente. **C)** y **D)** linealización de los datos en la región de Guinier para PcOvo y PcPV2, respectivamente. **E)** y **F)** gráficos de Kratky para PcOvo y PcPV2, respectivamente. **G)** y **H)** distribución de pares de distancias obtenida para PcOvo y PcPV2, respectivamente, usando el programa GNOM v4.5. Líneas rojas y negras: perivitelinas aisladas de GA y huevo, respectivamente.

Tabla 3.1. Comparación de los parámetros geométricos de las perivitelinas aisladas de huevo y GA obtenidos a partir de los datos de SAXS.

	Eje mayor (Å)	Eje menor (Å)	Radio de giro (Å)
PcOvo (Huevo)	$52,5 \pm 1,0$	$125,5 \pm 1,6$	$42,3 \pm 0,07$ *
PcOvo (GA)	$52,3 \pm 1,2$	$127,0 \pm 3,7$	$43,03 \pm 0,25$ *
PcPV2 (Huevo)	$42,0 \pm 0,5$	$166,1 \pm 0,7$	$44,43 \pm 0,36$
PcPV2 (GA)	$42,4 \pm 1,1$	$167,9 \pm 2,8$	$44,54 \pm 0,28$

Los valores corresponden al promedio de 5 determinaciones \pm DE. * indica diferencias significativas entre los valores ($p < 0,05$).

3.4.1.2. Estructura secundaria y terciaria

El perfil de los espectros de absorción en la región UV-visible (Fig. 3.5 A) fue coincidente para PcOvo aislada de huevo y GA, sugiriendo que no habría diferencias en el sitio de unión del carotenoide independientemente de su fuente de origen. Ambos espectros están caracterizados por cuatro máximos de absorción en la región visible (433, 477, 508 y 541 nm), sin embargo PcOvo de GA presenta una mayor intensidad en esta región que podría corresponderse con un mayor contenido de carotenoides (Fig. 3.5 A). En el caso de PcPV2, no se observaron diferencias en sus espectros de absorción en la región UV independientemente de su fuente de origen. En la figura 3.5 B se observa como ambos espectros se superponen y en la figura 3.5 C y D se presenta la cuarta derivada de los espectros entre 240 y 320 nm, donde puede observarse que los mínimos y máximos son coincidentes para ambas perivitelinas independientemente del origen de las mismas.

Los espectros de emisión de fluorescencia de las perivitelinas purificadas de huevo y de GA muestran que cada una de ellas presenta un máximo de emisión bien definido a 325 y 332 nm para PcOvo y PcPV2 respectivamente (Fig. 3.5 E). En ambos casos no se observan diferencias significativas en función de la fuente de origen, por lo cual no hay evidencias para considerar que difieran en su estructura terciaria.

Finalmente, los espectros de CD en el UV lejano indican que tampoco hay diferencias en la estructura secundaria entre PcOvo y PcPV2 en función de la fuente de origen (Fig. 3.5 F).

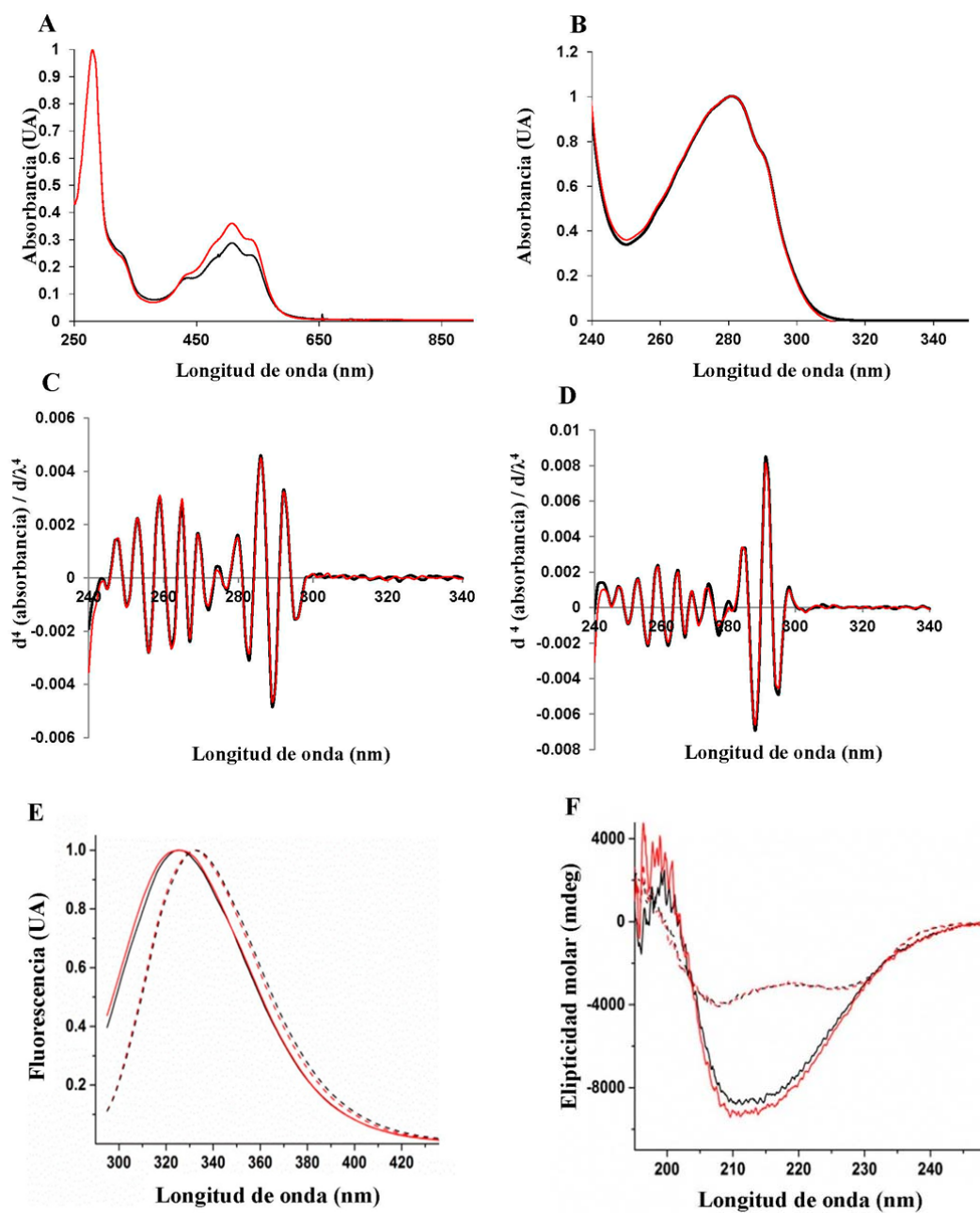


Figura 3.5. A) Espectro de absorción de PcOvo y B) PcPV2 aisladas de GA (línea roja) y de huevo (línea negra). C) Cuarta derivada de los espectros de absorción entre 240 y 340 nm de PcOvo y D) PcPV2 aisladas de GA (línea roja) y de huevo (línea negra). E) Espectros de fluorescencia y F) de CD en el UV lejano de las perivitelininas aisladas de huevo y GA. Líneas continuas: PcOvo de GA (roja) y de huevo (negra). Líneas punteadas: PcPV2 de GA (roja) y de huevo (negra). Los espectros fueron tomados a pH 8,5.

3.4.1.3. Estabilidad estructural frente al pH

Los espectros de emisión de fluorescencia de PcOvo y PcPV2 aisladas de la GA no mostraron variaciones en cuanto a la posición de su máximo de emisión ni en el valor de su centro de masa a lo largo del rango de pH estudiado (entre 2,0 y 12,0), sugiriendo que el entorno electrónico del Trp no se vio afectado por el pH del medio. Sin embargo, para ambas perivitelinas se observó una diferencia en la intensidad del máximo de emisión bajo estas condiciones (Fig. 3.6).

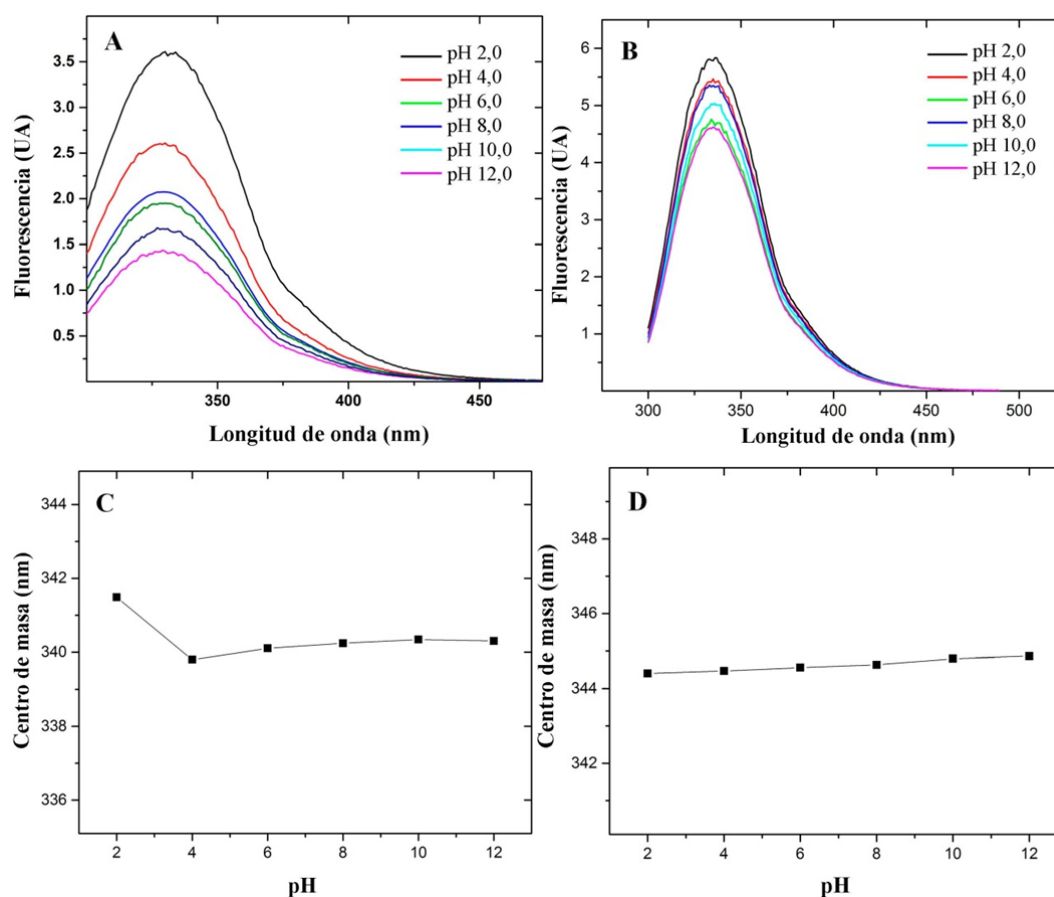


Figura 3.6. Estabilidad estructural frente al pH de las perivitelinas aisladas de GA. Espectro de emisión de fluorescencia a distintos valores de pH de **A)** PcOvo y **B)** PcPV2. Evolución del centro de masa de los espectros de **C)** PcOvo y **D)** PcPV2.

Del mismo modo, los espectros de absorción de las muestras de PcOvo mostraron una disminución en la intensidad en la región visible y UV en función del valor de pH (Fig. 3.7). El máximo cercano a los 340 nm que se observa en los espectros

corresponde a la absorción de los carotenoides presentes en esta perivitelina. Este resultado indica que los carotenoides y/o su sitio de unión a PcOvo serían afectados por el pH del medio. Considerando que los carotenoides son capaces de absorber la emisión de fluorescencia del Trp (efecto de apagado o *quenching* de fluorescencia), en caso de verse afectados podrían modificar la intensidad de emisión de fluorescencia de la proteína. Esto podría explicar las diferencias en los espectros de emisión observadas, al menos para el caso de PcOvo.

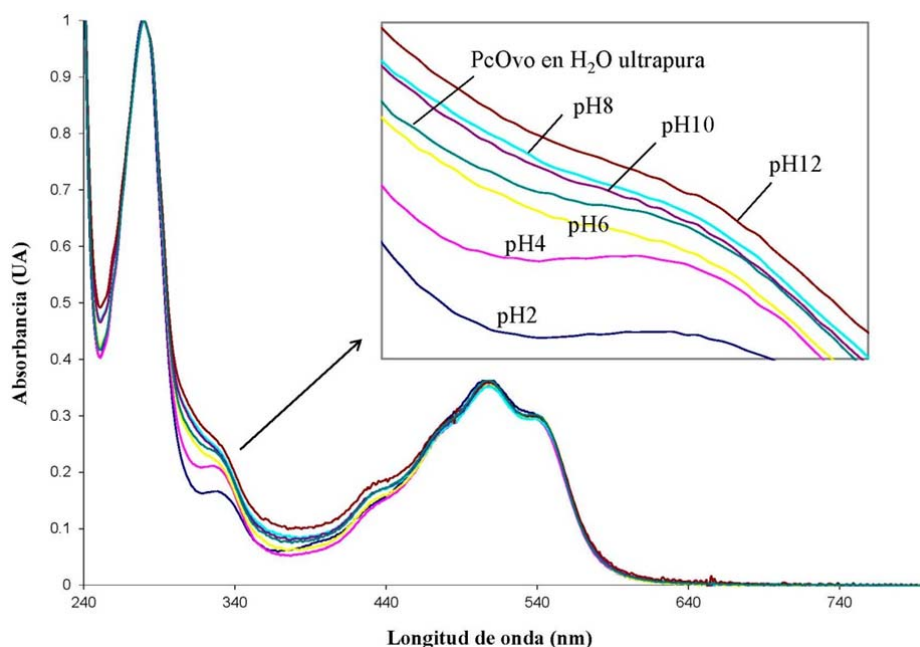


Figura 3.7. Espectros de absorción UV-visible de PcOvo a distintos valores de pH normalizados a 280 nm. Cuadro interno: Detalle de la región 300 - 345 nm.

3.4.1.4. Susceptibilidad a la proteólisis limitada

Con el objetivo de evaluar diferencias en el grado de exposición relativa de las subunidades proteicas de PcOvo y PcPV2 en función de su fuente de origen, así como diferencias en su flexibilidad, se llevó adelante un ensayo de digestión limitada con proteinasa K. No se observaron diferencias en la susceptibilidad frente a esta enzima independientemente del origen de las perivitelinas (Fig. 3.8). En el caso de PcOvo, sus dos formas fueron resistentes a la digestión incluso luego de una incubación de 40 min con 100 mg/mL de la enzima (no se muestra en el gel). PcPV2 no mostró tan alto nivel de resistencia a la digestión, en especial para el caso de su subunidad de 67 kDa. Sin

embargo no se observaron diferencias en el grado de susceptibilidad entre ambas formas de PcPV2.

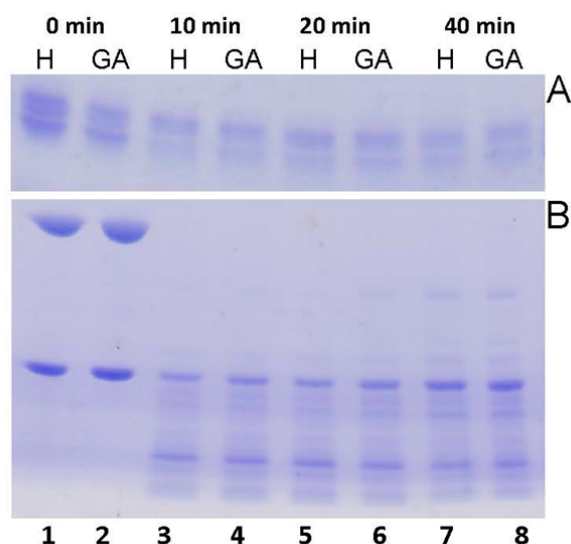


Figura 3.8. Susceptibilidad a la proteólisis limitada con proteinasa K de PcOvo **A)** y PcPV2 **B)** de huevo (H) y GA analizados por SDS-PAGE (4-20%). Calles 1, 3, 5 y 7: perivitelinas aisladas de huevo. Calles 2, 4, 6 y 8: perivitelinas aisladas de GA. Las muestras fueron incubadas con proteinasa K durante 0, 10, 20 y 40 min.

3.4.2. Caracterización funcional de las perivitelinas

3.4.2.1. Resistencia a la digestión gastrointestinal simulada

Mediante un sistema *in vitro*, evaluamos si la propiedad antinutritiva de las perivitelinas PcOvo y PcPV2 aisladas de huevo también está presente en sus formas aisladas de la GA. Se observó que ambas resistieron la digestión gastrointestinal simulada en el mismo grado independientemente de la fuente de origen (Fig. 3.9). En el caso de las formas de PcPV2, ambas mostraron la misma resistencia a la digestión, que no fue tan absoluta como la de PcOvo, tal y como fue registrado previamente en estudios de las perivitelinas de huevos (Dreon et al. 2013). En el caso de la subunidad menor de PcPV2, ésta presentó cierta susceptibilidad frente a la pepsina.

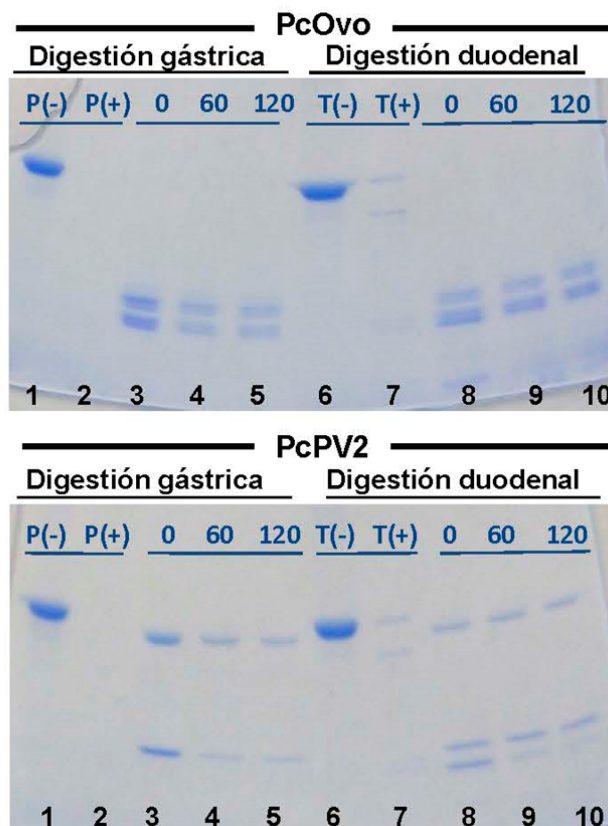


Figura 3.9. Digestión gastrointestinal simulada de las perivitelinas aisladas de la GA. Calles 1 y 2: controles negativos y positivos de la fase gástrica con BSA; calles 3-5: subunidades de PcOvo y PcPV2 luego de la incubación con pepsina por 0, 60 y 120 min; calles 6 y 7: controles negativo y positivo de la fase duodenal con BSA; calles 8-10: subunidades de PcOvo y PcPV2 incubadas con tripsina luego de 0, 60 y 120 min. Se observa una tenue banda por debajo de la subunidad de 31 kDa de PcPV2 en las calles 8-10 que corresponde a la tripsina.

3.4.2.2. Inhibición de tripsina

La fracción soluble de la GA presentó una alta capacidad de inhibir la actividad de la tripsina. Pudo determinarse que 1 mg de la proteína de esta fracción generó una disminución de $69,79 \pm 1,25$ UE en la actividad de la enzima, lo cual representa un 90% de inhibición de la actividad enzimática. Este grado de actividad inhibitoria no se vio afectada significativamente ($p > 0,05$) cuando la fracción soluble de GA fue sometida a una digestión gástrica simulada, donde 1 mg de proteína produjo una inhibición de la actividad de tripsina de $68,77 \pm 0,39$ UE.

3.4.2.3. Toxicidad

Se determinó la DL50, 96h de la fracción soluble de la GA. En la figura 3.10 se grafica el porcentaje de mortalidad en función de la dosis, con el típico comportamiento sigmoideo ($r^2 = 0,99$). El valor de DL50 determinado con el software Probit 1.5, fue de 5,9 mg/Kg de ratón. La sintomatología presentada por los ratones fue similar a la observada para los ratones inyectados con FPV, previamente descrito por Heras et al. (2008), incluyendo hipotermia, debilidad, letargo y pelo hirsuto.

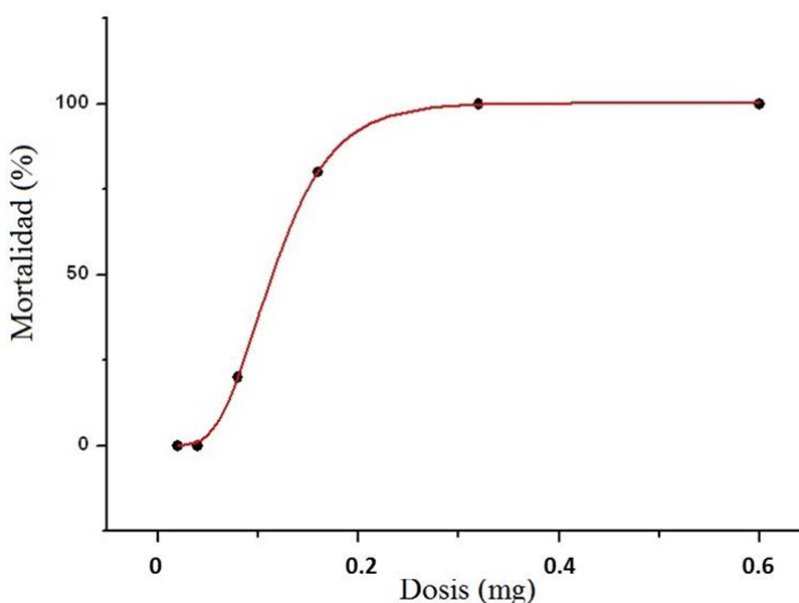


Figura 3.10. Curva de mortalidad de ratones a las 96 h post-inyección de distintas dosis de proteínas totales de la fracción soluble de la GA.

3.5. Discusión

En contraste con la maduración de las vitelogeninas de otros invertebrados, no se sabía si los precursores de las perivitelinas sufrían grandes cambios estructurales durante su maduración y almacenamiento en la GA. En el presente trabajo se analizaron las propiedades estructurales y funcionales de las perivitelinas de *P. canaliculata* aisladas de huevo y GA, aportando conocimiento sobre su maduración y su relación con el comportamiento alimenticio de algunos depredadores.

Los estudios realizados sobre las principales perivitelinas de *P. canaliculata*, PcOvo y PcPV2, muestran que la estructura y función de las formas aisladas de la GA resultan comparables a sus respectivas formas finales aisladas de huevos. Es decir, que

estos resultados evidencian que la GA almacena las perivitelinas en sus formas maduras, listas para ser incorporadas a los huevos, en lugar de contar con formas inactivas que pudieran requerir un procesamiento proteolítico u otras modificaciones importantes en su estructura, las cuales hubiesen sido fácilmente detectadas con las técnicas biofísicas y bioquímicas empleadas. Prácticamente todos los parámetros estructurales evaluados en ambas formas de PcOvo no evidencian diferencias. Siendo que, independientemente de su fuente, presenta el mismo tamaño, forma global, composición apoproteica, susceptibilidad frente a la proteinasa K, estructura terciaria y secundaria, cargas superficiales y resistencia frente al pH, las pequeñas diferencias observadas en el radio de giro no obedecerían a un clivaje de la cadena polipeptídica u otro tipo de modificación estructural importante. Estas diferencias podrían deberse a modificaciones postraduccionales más sutiles como una glicosilación diferencial de ambas formas de la perivitelina, aunque deberían desarrollarse ensayos para evaluar esta suposición y determinar en todo caso si existe alguna implicancia funcional asociada a esta diferencia. Por otro lado, PcOvo aislada de GA mostró un contenido mayor de carotenoides que la forma aislada de huevo. Esto probablemente esté relacionado con una degradación del pigmento en los huevos ya que la radiación solar y las altas temperaturas, presentes en el ambiente donde las hembras depositan las masas de huevos, son factores que se ha demostrado que degradan los carotenoides de esta perivitelina (Dreon et al. 2004b). En el caso de la perivitelina PcPV2 no se encontraron diferencias en ninguno de los parámetros estructurales evaluados.

Dado que la estructura determina la función, la ausencia de diferencias estructurales entre las formas aisladas de huevo y GA de PcOvo y PcPV2 se vio reflejada en su actividad biológica. De este modo, la fracción soluble de la GA presentó actividad neurotóxica frente a ratones. La toxicidad del órgano resultó 2,6 veces menor que la de los huevos (Heras et al. 2008), lo que está de acuerdo con la concentración de la toxina en la GA que es 1/3 de la del huevo (Dreon et al. 2002). Es decir, la proteína presenta la misma toxicidad específica en ambas fuentes, la cual es comparable a la toxicidad de los venenos de serpientes (Butzke & Luch 2010). En el mismo sentido, la sintomatología de los ratones inoculados fue coincidente con la observada para los tratados con la neurotoxina PcPV2 de huevo (Heras et al. 2008) con signos y síntomas de afectación del sistema nervioso central. Por otro lado, con respecto a la resistencia a la digestión, ambas perivitelinas aisladas de la GA resistieron al tratamiento de digestión gastrointestinal simulada *in vitro*, lo cual sugiere que llegarían activas al

intestino de un potencial depredador, así como fuera determinado para las perivitelinas PcOvo y PcPV2 de huevo (Dreon et al. 2013, Dreon et al. 2008). Finalmente, la fracción soluble de la GA presentó una fuerte actividad inhibitoria de tripsina lo cual indica que la ingestión del órgano limitaría la capacidad de digerir nutrientes a un depredador.

Siendo que los estudios funcionales indican que la GA presenta propiedades antinutritivas, antidigestivas y neurotóxicas, esto podría explicar el comportamiento de descarte del órgano por parte de algunos de los depredadores de adultos de la especie, en especial los de menor masa corporal, como la rata, el gavián y el carrrao. Otros depredadores, como caimanes y tortugas, se alimentan de todo el caracol con la conchilla incluida, que en algunos casos podría entenderse por la mayor masa corporal del depredador, si bien aún no se han realizado estudios que lo determinen (Borteiro et al. 2009, Yoshie & Yusa 2008). Excepto sobre especies del género *Pomacea*, no hay reportes de dicho comportamiento de descarte sobre otros gasterópodos, incluso dentro de la familia Ampullariidae. Por ejemplo, en el norte de Colombia *Marisa cornuarietis* y *Pomacea chemnitzii* son ambos depredados por el gavián caracolero pero en el caso de la primera no se ha observado un descarte de la GA (Snyder & Kale 1983). *Marisa cornuarietis* es una especie de ampulárido que deposita sus huevos en el agua y sin una coloración de tipo aposemática, por lo cual es probable que las perivitelinas de esta especie no sean tóxicas. El estudio de las defensas provistas por las perivitelinas en distintos clados dentro de la familia Ampullariidae, con diferencias en sus hábitos de oviposición, sería valioso para comprender este fenómeno. Por otro lado, la GA es el único órgano descartado por parte de los depredadores, lo cual es congruente con el hecho de que las perivitelinas son exclusivamente sintetizadas y almacenadas en este órgano no habiendo sido detectada su presencia en otros órganos ni circulando por la hemolinfa (Dreon et al. 2003, Dreon et al. 2002). Finalmente proponemos que la coloración rojiza contribuiría a este comportamiento de descarte de la GA por el depredador, en la asociación del color llamativo del órgano con su nocividad.

Hasta el presente trabajo, no existían estudios que contemplen un análisis comparativo de la estructura-función de las perivitelinas y sus precursores que establecieran la ausencia de cambios estructurales sustanciales en estas proteínas. En la literatura existen estudios sobre perivitelinas aisladas en la GA de otros gasterópodos, donde se reporta su actividad biológica. Estos estudios abarcan algunas especies marinas, de agua dulce y terrestres pertenecientes a los clados Opisthobranchia y Pulmonata (Hathaway et al. 2010, Mukai et al. 2004, Nagle et al. 2001, Sanchez et al. 2006, Takamatsu et al. 1995),

y aunque fueron enmarcados en otro contexto, sus resultados sugerirían que el mecanismo perivitelogénico presente en ampuláridos podría encontrarse también presente en otros gasterópodos con GA. Este mecanismo no involucraría el procesamiento estructural de un precursor inmaduro, típico de las vitelinas de otros grupos de invertebrados, y probablemente represente una vía más eficiente para la conversión de alimento en huevos, haciendo posible un mayor rendimiento reproductivo en las especies de gasterópodos con GA.

4.

**Evaluación del contenido
energético-nutritivo de machos
y hembras de *P. canaliculata***

4.1. Introducción

El descarte de la GA cuando los depredadores se alimentan de adultos de *P. canaliculata* no sólo resulta llamativo y de causas no conocidas, lo cual fue abordado en la sección 3, sino también es interesante desde el punto de vista de la ecología trófica, por las implicancias energéticas que podría significar para el depredador descartar un órgano que contribuye significativamente a la biomasa corporal de la hembra adulta independientemente de su estado nutricional (Estoy et al. 2002). La composición bioquímica de la GA no había sido determinada hasta el momento de realizar este trabajo de Tesis, pero dado su papel en la síntesis y almacenamiento de los componentes nutritivos de los huevos, sería de esperar que la pérdida nutricional asociada al descarte de este órgano fuese importante. Este aspecto resulta particularmente interesante desde una perspectiva ecológica, en lo referido a la interacción depredador-presa, en especial para el caso del gavilán caracolero dado el alto grado de especialización en sus hábitos alimenticios. En nuestra región contamos con dos estudios previos enfocados en *P. canaliculata* como presa del gavilán caracolero, los cuales reportan dentro de la provincia de Buenos Aires los tamaños de caracoles adultos consumidos (De Francesco et al. 2006, Mapelli & Kittlein 2011). Esto también ha sido determinado para otras especies del género *Pomacea*, en otras regiones del continente (desde Brasil hasta Florida) y en general se observa que los caracoleros consumen las presas de tallas intermedias a mayores (alrededor de 30 y 60 mm normalmente, aunque depende de la especie sobre la cual depreden), probablemente porque sean más fáciles de detectar visualmente y/o de asir (Beissinger 1983, Bourne 1993, Cattau et al. 2010, Collett 1977, Estela & Naranjo 2005, Sykes 1987, Tanaka et al. 2006). El consumo de las presas de mayor tamaño podría implicar un consumo diferencial de hembras sobre machos siendo que éstas alcanzan las tallas mayores en las poblaciones (Estebenet et al. 2006). Esto es otro aspecto interesante que nunca había sido evaluado en el gavilán caracolero y que a su vez pone nuevamente de relieve la importancia de conocer las características nutricionales diferenciales de las hembras y machos de los caracoles.

4.2. Objetivos e hipótesis:

- 1) Determinar la composición bioquímica de la GA de *P. canaliculata* así como su contenido energético.
- 2) Analizar si existen diferencias entre machos y hembras de *P. canaliculata* en la composición bioquímica y el contenido energético de los tejidos blandos consumidos por los depredadores.
- 3) Determinar el contenido energético que efectivamente se encuentra disponible en un individuo completo, hembra y macho, considerando las tallas, y en el caso de las hembras, el descarte de la GA.

De este modo se aborda el comportamiento de descarte de la GA por parte de los depredadores de adultos de *P. canaliculata* desde una perspectiva nutricional. Hipotetizamos que la contribución de la GA a las partes blandas de la hembra es significativo desde el punto de vista energético y nutritivo, y que por lo tanto el consumo de hembras de *P. canaliculata* representa una desventaja para los depredadores como consecuencia del descarte del órgano.

4.3. Metodología

4.3.1. *Composición bioquímica y contenido energético de los tejidos de Pomacea canaliculata*

4.3.1.1. Material biológico

Se recolectaron nueve hembras y nueve machos de *P. canaliculata* del cuerpo de agua artificial del paseo del bosque de la Ciudad de La Plata en el mes de enero (34°54'36"S; 57°56'16"O). Los individuos que se recolectaron fueron adultos, siendo seleccionados a partir de parejas en cópula. Las partes blandas fueron disecadas y pesadas, y en el caso de las hembras se retiró la GA y se registró su peso por separado. Se determinó la composición proximal del cuerpo completo de machos, del cuerpo de

hembras excluyendo la GA y de la GA aislada. Las muestras, en los tres casos, fueron procesadas y analizadas en tres grupos compuestos por tres individuos/órganos cada uno, los cuales fueron homogeneizados con una multiprocesadora de mano usando buffer Tris 20 mM HCl pH 7,5 en una relación 2:1. Alícuotas de estos homogenatos se utilizaron como material de partida para cada una de las determinaciones que se detallan a continuación. Para los métodos colorimétricos, la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible (Agilent Technologies, Inc.) y en todos los casos tanto las muestras como cada punto de la curva estándar se midieron por triplicado.

4.3.1.2. Cuantificación de lípidos

Los lípidos totales fueron extraídos siguiendo la metodología descrita por Bligh y Dyer (1959) y su contenido fue determinado gravimétricamente. En resumen, el homogenato fue incubado durante toda la noche con una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (v/v) en una relación muestra:solvente de extracción 1:20 (v/v). La muestra fue posteriormente filtrada para eliminar los restos de tejido, y al filtrado se le adicionó una solución acuosa de NaCl 1,8 %. Se logra así la separación de la mezcla en dos fases, una inferior (clorofórmica), que contiene los lípidos extraídos, y una superior (de metanol y agua), que contiene las moléculas más polares. La fase superior fue descartada y se transfirió la inferior a un vial previamente tarado para determinar el contenido de lípidos por gravimetría. El solvente de esta fase fue evaporado bajo corriente de N₂ y el vial fue pesado repetidas veces hasta alcanzar un peso constante en una balanza microanalítica (Mettler Instrument corporation).

4.3.1.3. Cuantificación de proteínas totales

El contenido de proteínas totales fue determinado utilizando la metodología descrita en Markwell et al. (1978). Se trata de una modificación del método original de Lowry et al. (1951) para la cuantificación de proteínas, descrito en la sección 3.3.7, pero con el agregado de SDS al reactivo alcalino y un incremento en la cantidad de tartrato. Estas modificaciones, sumadas a una digestión previa de la muestra con NaOH 1M permiten cuantificar las proteínas directamente del tejido sin necesidad de

solubilizarlas previamente. La cuantificación se realizó construyendo una curva estándar con BSA (Sigma Aldrich) de 6 puntos de entre 0,03 mg/mL y 0,18 mg/mL.

4.3.1.4. Cuantificación de polisacáridos

Los polisacáridos fueron cuantificados colorimétricamente luego de haber sido precipitados siguiendo el método descrito por Van Handel (1965) como se describe a continuación. El tejido fue tratado con una solución de KOH en un baño a 100°C, condiciones en las cuales los polisacáridos no son degradados. Posteriormente se adicionó etanol al 96% que precipita los polisacáridos junto con una solución de Na₂SO₄ que actúa como un coprecipitante haciendo más efectivo el proceso. Luego se resuspendió el precipitado en una solución de ácido tricloroacético para eliminar las proteínas y los ácidos nucleicos por precipitación. La cuantificación de polisacáridos se realizó con el reactivo de antrona en ácido sulfúrico que consta de una digestión dejando hexosas libres que a su vez se deshidratan quedando como furfurales. Éstos reaccionan con la antrona y dan un producto coloreado que tiene un máximo de absorbancia a 620 nm. Para la cuantificación del polisacárido (galactógeno) se utilizó como estándar galactosa (Sigma Aldrich) en vez de glucosa con un rango de 0,02 a 0,2 mg/mL.

4.3.1.5. Cuantificación de carbohidratos solubles

Los carbohidratos solubles fueron cuantificados sobre la fracción soluble, preparada siguiendo la metodología descrita en la sección 3.3.2, y aplicando la metodología descrita por Dubois et al. (1956). Este último es un método colorimétrico que permite cuantificar el contenido total de pentosas, hexosas y sus derivados. Involucra la reacción de Molisch, la cual se basa, al igual que en el método anterior, en la acción hidrolizante y deshidratante que ejerce el ácido sulfúrico sobre los hidratos de carbono obteniendo como resultado furfurales, que son derivados aldehídicos del furano. Los furfurales se condensan con los fenoles para dar productos coloreados que pueden ser cuantificados espectrofotométricamente. Se realizó una curva de calibración usando D-glucosa (Sigma Aldrich) como estándar.

4.3.1.6. Determinación del peso seco

El peso seco (PS) fue determinado gravimétricamente luego de secar las muestras a 130°C durante 21 h.

4.3.1.7. Determinación del contenido de energía de los tejidos

El contenido de energía fue calculado empleando los factores de conversión previamente aplicados para *P. canaliculata* por Heras et al. (1998). Éstos son: para carbohidratos 4,1 kcal/g, proteínas: 4,3 kcal/g y lípidos: 7,9 kcal/g.

4.3.1.8. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas en la composición bioquímica fueron evaluadas mediante test de t a dos colas con un intervalo de confianza del 95%, usando el software Graphpad Instat v.3.05.

4.3.2. *Biomasa y contenido energético de hembras y machos en función de la talla*

La biomasa en peso seco para machos y hembras en función de la talla, dentro de un rango de 20 y 80 mm, fue calculada aplicando la relación talla-peso descripta por Estebenet (1998):

$$\log(\text{PS}) = \log(a) + b * \log(\text{talla})$$

Donde la pendiente es común para ambos sexos ($b = 3,164 \pm 0,086$) y la ordenada al origen difiere entre sexos (machos $\log(a) = -2,151$ y hembras $\log(a) = -2,034$). Esta relación indica que para cualquier talla, las hembras son significativamente más pesadas que los machos. Posteriormente se calculó este mismo valor restando la contribución de la GA a la biomasa corporal de las hembras dentro del mismo rango de tallas. Para esto se utilizó la proporción del peso seco que representa la GA en las partes blandas del cuerpo de la hembra, que fue determinada a partir de un muestreo de 34 hembras. Estos individuos fueron recolectados del cuerpo de agua artificial del paseo del bosque de la Ciudad de La Plata, la misma localidad de muestreo que utilizó Estebenet en su trabajo para determinar la relación entre el peso y la talla. La talla de

estos individuos fue medida con un calibre considerando la longitud entre el ápice y la base de la apertura de la conchilla. Finalmente los valores de biomasa en función de la talla fueron convertidos a Kcal en función de la talla utilizando los datos de contenido energético de machos, hembras y GA generados en el presente trabajo de Tesis.

4.4. Resultados

4.4.1. Composición bioquímica y contenido energético de los tejidos de Pomacea canaliculata

Se determinó la composición bioquímica proximal de las partes consumibles de machos (partes blandas) y hembras (partes blandas excluyendo la GA) siendo las proteínas el componente principal para ambos sexos, seguidas por los carbohidratos y los lípidos (Tabla 4.1). Se observaron diferencias significativas entre sexos sólo en el contenido de proteínas, siendo más abundantes en machos ($p = 0,038$). Del mismo modo, el contenido calórico de machos y hembras fue significativamente diferente ($p = 0.029$) mostrando la misma tendencia (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Comparación de la composición bioquímica y contenido energético de los tejidos blandos de especies del género *Pomacea*.

	<i>P. canaliculata</i> ¹			<i>P. maculata</i> ²	<i>P. paludosa</i> ³
	Macho	Hembra ^A	GA		
Glúcidos totales	10,8 ± 2,7	6,9 ± 1,6	4,7 ± 0,6	11,0 ± 5,6	NA
Proteínas	47,6 ± 1,0 *	41,7 ± 3,2 *	16,6 ± 0,9	63,6 ± 6,3	36,3
Lípidos	5,4 ± 0,3	5,4 ± 0,4	3,3 ± 0,2	2,9 ± 0,2	3,4
Polisacáridos	4,7 ± 1,7	2,4 ± 1,6	4,0 ± 0,6	NA	NA
Glúcidos solubles	6,0 ± 2,7	4,6 ± 1,6	0,7 ± 0,2	NA	NA
Cenizas	NA	NA	NA	22,5 ± 2,5	32,1
Humedad	81 ± 1,0	81 ± 2,1	57,9 ± 5	86,6 ± 2,4	85,5
Kcal/g PS	2,91 ± 0,16 *	2,50 ± 0,14 *	1,60 ± 0,02	3,25 ± 0,11	4,60 ± 0,18

Composición bioquímica expresada como % PS. Los valores representan los promedios ± DE, NA: no analizado. 1 valores determinados en este estudio; 2 Cattau et al., 2010; 3 Sykes, 1987. Dichos autores no discriminaron hembras y machos, probablemente las muestras estén constituidas por una mezcla de ambos sexos. ^A Hembras sin la GA. * indica diferencias significativas entre grupos (análisis llevado a cabo únicamente entre partes comestibles de hembras y machos de *P. canaliculata*).

4.4.2. Estimación de la biomasa corporal de machos y hembras y su contenido de energía en función de la talla

El valor promedio de la biomasa corporal expresada como peso seco, y su contenido energético en función de la talla y del sexo se muestra en las figuras 4.1 A y B respectivamente. Según los valores estimados para estos parámetros, la biomasa remanente luego de la eliminación de la GA en la hembra ($28 \pm 6\%$ del peso seco) presenta un valor equivalente al de las partes blandas de un macho de la misma talla, siendo éstas sólo un 6% más livianas que los machos en estas condiciones (Fig. 4.1 A). Sin embargo, el remanente de las hembras una vez que se elimina la GA, es decir, lo que efectivamente consume un depredador, contiene estimativamente un 19% menos de energía que un macho de la misma talla (Fig. 4.1 B).

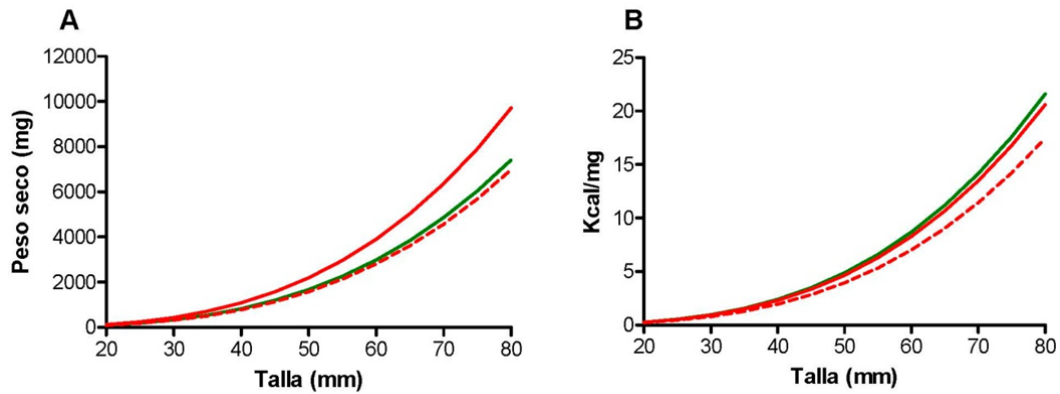


Figura 4.1. A) Biomasa y B) contenido energético según sexo y talla en *P. canaliculata*, estimada con la ecuación de crecimiento alométrico de Estebenet (1998). Línea continua: cuerpo completo de macho (verde) y hembra (rojo). Línea punteada roja: hembra sin GA.

4.5. Discusión

El análisis bioquímico de los macronutrientes disponibles en las partes blandas de *P. canaliculata* indica que existen diferencias significativas entre sexos en los tejidos efectivamente consumidos por los depredadores, tanto en su contenido de energía como en su composición bioquímica. Estas diferencias indican que a pesar de que a una misma talla (> 40 mm) las hembras tienen mayor biomasa de tejidos blandos, el depredador que las consume incorpora menos energía y proteínas como consecuencia del descarte de la GA. Esto refleja la gran contribución de la GA a la biomasa corporal de la hembra y la gran inversión de energía movilizada hacia este órgano para la reproducción. Desde el punto de vista del depredador, esta diferencia en el contenido de energía implica que le resultaría desventajoso consumir hembras. También podríamos pensar que el costo energético del transporte hasta el posadero, considerando que son más pesadas, y el tiempo de manipuleo para eliminar la GA, podrían disminuir su rendimiento energético, aunque esta pérdida de energía se considera irrelevante en comparación con la energía que insumiría la búsqueda y captura de la presa (Beissinger 1983). Por otro lado, las altas densidades de las poblaciones de estos caracoles y las tallas que pueden llegar a alcanzar (Hayes et al. 2015), compensarían el bajo contenido energético de las especies del género *Pomacea* en general (ver tabla 4.1), lo cual aseguraría la biomasa necesaria para sustentar las poblaciones de un depredador especialista como es el gavián caracolero.

Con respecto al contenido de energía de los tejidos de *P. canaliculata*, éste resultó ser algo menor al de otras especies del género, *P. dolioides*, *P. paludosa* y *P. maculata* (Beissinger 1983, Cattau et al. 2010, Sykes 1987). Esto probablemente no se deba a diferencias entre las especies, sino que puede ser consecuencia de las distintas metodologías aplicadas, ya que en los otros casos el contenido energético se determinó mediante una bomba calorimétrica, considerando la contribución de otras fuentes de carbono reducidas, además de proteínas, lípidos e hidratos de carbono, no incluidas en nuestro análisis.

Desde un punto de vista ecológico, la interacción del especialista *R. sociabilis* con su presa *Pomacea* provee claramente un excelente modelo de relación depredador – presa para el estudio de la transferencia de energía y nutrientes, y de la selección de presas. Con respecto a este último aspecto, y si se considera la desventaja energética que representa el consumo de hembras de *P. canaliculata* para un depredador, surge inmediatamente la pregunta de si existe selección de sexos por parte del gavián caracolero. Este aspecto fue evaluado en el marco de una colaboración con la Dra. Silvana Burela y el Dr. Pablo R. Martín del Laboratorio de Ecología, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur. No obstante, considerando que tales datos no pertenecen a la autora de la presente tesis doctoral, sólo se mencionarán brevemente a continuación, contando con el consentimiento de los investigadores previamente mencionados. A partir de los estudios de campo realizados, se determinó el índice de proporción de forrajeo del gavián caracolero el que mostró una selección hacia las tallas más grandes. Las hembras fueron depredadas preferencialmente durante la mayor parte del período de muestreo, aunque esto probablemente sea una consecuencia secundaria del consumo de los individuos de mayor talla disponibles. De hecho, el único momento en que se verificó un consumo preferencial de machos fue en el único mes en que éstos dominaron las tallas mayores en la población. En el apéndice de la presente tesis se detalla la metodología aplicada y los resultados obtenidos.

En resumen, los resultados de contenido energético y valor nutricional de los tejidos consumidos indicaban que sería esperable una selección de machos por parte de los depredadores. No obstante, los datos de campo muestran que hay una selección sólo en función de la talla que, en la población estudiada y probablemente en muchas otras (por el predominio general de las hembras en las tallas mayores), llevaría a un consumo preferencial de hembras, si bien esto no ha sido determinado para ninguna otra especie

del género *Pomacea*. Los caracoleros probablemente no sean capaces de discriminar el sexo de sus presas considerando que en *P. canaliculata* el dimorfismo sexual se restringe a la forma del opérculo y de la abertura de la conchilla (Estebenet et al. 2006), que probablemente no sean visibles para un caracolero sobrevolando un cuerpo de agua en busca de una presa. Por otro lado, debido al hábito migratorio del caracolero (Bennetts & Kitchens 2000, Posso et al. 2012), éste depreda sobre distintas especies del género *Pomacea* con diferencias en sus caracteres sexuales secundarios (Estebenet et al. 2006, Hayes et al. 2015) y posiblemente con diferencias en la nocividad de la GA, lo cual tal vez haya evitado el desarrollo de la habilidad de depredar preferentemente sobre machos.

5.

**Dinámica de los principales
componentes de secreción de la GA
frente al esfuerzo reproductivo y la
actividad reproductiva en *P. canaliculata***

5.1. Introducción

En las secciones anteriores determinamos que la GA sintetiza las principales perivitelinas de manera directa, almacenando las formas biológicamente activas, y que esto sería una posible explicación al comportamiento de descarte de la GA por los depredadores (sección 3). También evaluamos las consecuencias de este comportamiento, y analizamos la composición bioquímica y energética entre sexos (sección 4). En esta sección ahondamos en el estudio de la GA analizando la dinámica del órgano frente al esfuerzo reproductivo y los estímulos que afectan su metabolismo.

El parénquima de la GA está compuesto principalmente por adenómeros túbulo-acinosos formados por dos tipos celulares: las células albúmino secretoras y las células laberínticas (Catalán et al. 2006). Las primeras son las encargadas de la síntesis de las perivitelinas PcOvo y PcPV2 que se acumulan en su interior en forma de gránulos secretores. Estas células también contienen depósitos de calcio intracelulares, así como las células laberínticas, en las cuales este mineral también se puede encontrar en el espacio extracelular, asociado a la membrana plasmática basal de las mismas (Catalán et al. 2006). Para una descripción más detallada sobre la síntesis del FPV y la vitelogénesis en invertebrados remitirse a la sección 3.1.1. De acuerdo a las variaciones morfológicas que muestran las células del parénquima a lo largo de un ciclo reproductivo de *P. canaliculata* en nuestras latitudes, se han establecido tres periodos: prereproductivo, reproductivo y postreproductivo, donde la morfología de estas células reflejan fundamentalmente la acumulación o liberación de calcio y gránulos secretorios (Catalán et al. 2006). De acuerdo con estos resultados, en el periodo reproductivo la ultraestructura de la GA muestra una elevada actividad biosintética y acumulación de los componentes que serán secretados para formar parte de la cápsula y FPV del huevo. Durante este mismo periodo, la actividad reproductiva de las hembras incluye el apareamiento y la oviposición. El apareamiento ocurre tanto de día como de noche, puede extenderse hasta 20 h (Burela & Martín 2011, Burela & Martín 2009) y suele involucrar un complejo comportamiento que ha sido dividido en cuatro etapas: precortejo, cortejo, cópula y postcópula. El precortejo involucra el acercamiento del macho y el contacto que éste realiza con la hembra mediante sus tentáculos cefálicos, los palpos bucales y/o el pie. Durante el cortejo el macho se desliza sobre la hembra hasta aproximarse al borde derecho de la conchilla, donde abre la cavidad del manto. La cópula se inicia cuando el macho introduce la vaina del pene en la cavidad del manto de

la hembra. La GA está directamente involucrada en la cópula siendo que el pene se introduce hasta las proximidades del receptáculo seminal recorriendo gran parte de su estructura, un proceso que requiere alrededor de 2 h. La liberación del esperma ocurre de manera constante durante las 10 h que puede durar la cópula (Burela & Martín 2011, Giraud-Billoud et al. 2012). Por otro lado, durante estas tres etapas la hembra puede rechazar al macho impidiendo la cópula, lo cual es frecuente, y por lo tanto cada una de las etapas no deviene necesariamente en la siguiente (Burela & Martín 2009). Por último, una vez que el macho retira la vaina del pene puede darse una postcópula, donde el macho queda adherido a la conchilla de la hembra y se mantiene sobre ella. Por otro lado, la oviposición es un evento que se da normalmente durante la noche, momento en el cual las hembras se desplazan hacia algún sustrato fuera del agua y liberan los huevos de a uno o de a pares (Albrecht et al. 1996). La duración del proceso es variable en función de la cantidad de huevos depositados, pero se ha registrado que puede extenderse hasta 5 h (Estebenet & Martín 2002).

Considerando el rol central de la GA en la reproducción, donde la fecundación, la acumulación de productos de secreción y su liberación deben necesariamente estar coordinadas, sería de esperar que la actividad reproductiva de la cópula y/o la oviposición, actuaran como estímulos en la GA alterando su metabolismo. En lo que respecta a los principales productos de secreción del órgano, hemos determinado en la sección 4 que estos son mayormente polisacáridos, perivitelininas y calcio (ver Tabla 4.1). Se desconocía en ampuláridos si su síntesis es constitutiva o es inducida por estímulos específicos, como aquellos vinculados con la actividad reproductiva de cópula y oviposición. A su vez, tampoco se había evaluado si el esfuerzo reproductivo (número de huevos depositados) tiene una consecuencia sobre la capacidad de síntesis y/o sobre los niveles acumulados de los productos de secreción en el órgano.

5.2. Objetivos e hipótesis:

- 1) Evaluar el efecto de la actividad reproductiva de cópula y oviposición sobre los niveles de los principales componentes de secreción acumulados en la GA y sobre la expresión de las principales perivitelinas en el órgano.
- 2) Cuantificar la movilización de los principales componentes de secreción hacia los huevos, y determinar si alguno de los mismos representa un factor limitante del esfuerzo reproductivo.

Con este estudio se busca contribuir al entendimiento de los procesos fisiológicos vinculados con la GA que puedan ayudar a explicar la notable fecundidad de la especie.

Hipotetizamos que la biosíntesis o la acumulación de alguno de los principales componentes de secreción es sensible a estímulos externos a la GA vinculados con la actividad reproductiva (cópula y/o oviposición). A su vez, esperamos que alguno de los principales componentes de secreción represente un factor limitante del rendimiento reproductivo.

5.3. Metodología

5.3.1. Muestreo

Se estableció un diseño experimental tal que todos los individuos utilizados, incluyendo los machos, provinieran de una misma masa de huevos y que fueran hermanos completos, es decir, que toda la cohorte compartiera el mismo padre. Se procuró de este modo reducir la variabilidad biológica entre las hembras, de especial importancia para las sensibles técnicas de biología molecular que se emplearían. Para esto, se partió de una hembra virgen proveniente del campo (Canal Pigüe-Venado 37° 09' 59" S, 62° 40' 28" O, al SO de la Provincia de Buenos Aires) que maduró en el laboratorio y copuló con un único macho. La descendencia de la puesta resultante fue criada en acuarios individuales, en condiciones controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (12 h luz/12 h oscuridad) y contenido de carbonato de calcio en el agua, y fue alimentada *ad libitum* con lechuga (Tamburi & Martín 2009).

Con el objetivo de evaluar hembras con distinto grado de esfuerzo reproductivo, y sometidas a diferentes estímulos/condiciones que pudieran afectar el metabolismo de la GA, se definieron 6 grupos de muestreo. Una vez que la cohorte alcanzó la madurez sexual (momento en el cual un grupo control de hembras comenzó a copular), se muestrearon 6 hembras que constituyeron el grupo de "vírgenes" (V). A todas las hembras restantes se les incluyó diariamente en el acuario a un macho y fueron observadas hasta el final de la jornada de muestreo (8 - 20 h) con el objetivo de identificar la actividad de cópula. Se consideró que la hembra había copulado cuando se observó la vaina del pene en la cavidad del manto de la hembra y el evento hubiera durado un mínimo de 3 h (Burela & Martin 2011). Una vez finalizada la cópula, el macho fue retirado del acuario y de este modo, durante los 39 días que duró el muestreo, cada hembra estuvo expuesta a un único evento de cópula, considerando que hembras con una única cópula presentan el mismo rendimiento reproductivo que aquellas que experimentan múltiples cópulas (Burela & Martin 2011). Seis hembras fueron muestreadas inmediatamente luego de que la cópula finalizara (C) y a las hembras restantes se las dejó que depositaran huevos. Otras 6 hembras fueron muestreadas inmediatamente luego de que depositaran la primera puesta (PP) y otras 6 cuando se verificara un tiempo "de receso" de entre 24-36 h dentro del cual no hubiesen depositado huevos luego de un evento de oviposición (R). Finalmente otros 2 grupos de hembras fueron muestreadas al final del período de estudio. Un primer grupo estuvo compuesto por 4 individuos que estuvieron depositando huevos durante un período extendido de 17 ± 6 días (PE), y adicionalmente se incluyó en el análisis un último grupo compuesto por 5 hembras que se identificaron como inmaduras (I) ya que permanecieron vírgenes hasta el final del período de muestreo, sin haber mostrado actividad reproductiva luego de 20 oportunidades de cópula. Un resumen gráfico de los grupos muestreados, incluyendo los primero 5 grupos, se presenta en la figura 5.1.

Durante el período de muestro se registró para cada hembra, el número de eventos de oviposición y el peso de cada puesta. De cada hembra se registró la talla, el peso del individuo completo (con conchilla), de las partes blandas sin la conchilla y el peso de la GA. A su vez, de cada GA se retiró el receptáculo seminal y se tomó aproximadamente 1mg de tejido glandular que se preservó en RNA later (Ambion) para una posterior extracción de ARN. La porción restante de cada GA se preservó a -70°C como material de partida para el resto de las determinaciones bioquímicas.

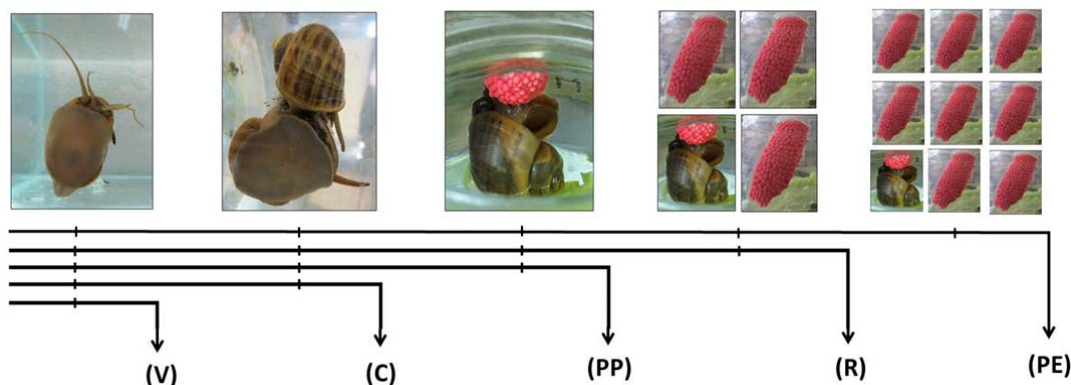


Figura 5.1. Esquema del muestreo de los primeros cinco grupos de hembras. **V:** vírgenes. **C:** luego de la cópula. **PP:** luego de que depositaran la primera puesta. **R:** luego de un tiempo “de reposo”. **PE:** luego de un período extendido de múltiples oviposiciones.

5.3.2. *Determinación del contenido de humedad*

El contenido de humedad de la GA se determinó por diferencia entre el peso húmedo y el peso seco de muestras de tejido de la GA de los 6 grupos de muestreo. Para la determinación del peso seco, las muestras fueron secadas en estufa a 130°C durante 19h. Tanto en este caso como para el resto de los análisis que se detallan a continuación, las muestras fueron analizadas individualmente y, a menos que se indique lo contrario, se evaluaron las muestras de los seis grupos.

5.3.3. *Preparación de la fracción soluble*

Se obtuvo la fracción soluble de las GA siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.3.2.

5.3.4. *Cuantificación de calcio total y calcio soluble*

Se cuantificó el calcio soluble en la fracción soluble de las muestras de GA mediante un kit comercial colorimétrico (Ca-color Wiener lab. SAIC, Rosario, Argentina) y utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible (Agilent Technologies, Inc.). El método se basa en la reacción entre el calcio y la cresoltaleína complexona a pH 11 que genera un producto coloreado que puede ser medido espectrofotométricamente a 570 nm. Para la determinación del calcio total de cada GA

fue necesario un tratamiento previo de solubilización del calcio cristalino presente en las muestras. Las muestras de tejido de GA se homogeneizaron en agua ultrapura en una relación 1:3 p/v. Posteriormente se agregó ácido nítrico concentrado en una relación 2:1 v/v (ácido: homogenato) que se dejó actuando hasta el día siguiente, cuando fue neutralizado con NaOH 12 M y centrifugado a 13.600 g durante 10 min para precipitar el material en suspensión. Finalmente se procedió a la cuantificación del calcio total del órgano presente en el sobrenadante obtenido.

5.3.5. Cuantificación de los polisacáridos

El contenido de polisacáridos se determinó siguiendo la metodología descrita en la sección 4.3.1.4.

5.3.6. Cuantificación de perivitelinas por ELISA

Los niveles acumulados de PcOvo y PcPV2 en la GA fueron determinados mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, comúnmente conocido como ELISA por su acrónimo del inglés "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay". Esta metodología permite determinar la presencia y/o concentración de un antígeno, anticuerpo u otro blanco presente en solución en una muestra, con límites de detección del orden de ng/mL o pg/mL. El método se basa en la formación de un complejo antígeno-anticuerpo inmovilizado en una placa que se evidencia por fluorescencia, colorimetría, radioactividad, entre otros.

La curva estándar se realizó empleando PcOvo y PcPV2 purificadas de GA como fue descrito en la sección 3.3.3. Se utilizaron placas Nunc-Immunoplate Maxisorp (Thermo Fisher Scientific) y el bloqueo se realizó con 1% de BSA (Sigma Aldrich). Los anticuerpos anti-PcOvo y anti-PcPV2 (anticuerpos primarios policlonales elaborados en conejo) se diluyeron en PBS-Tween con 0,5% de BSA (1/5000 y 1/20000 respectivamente) y el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-inmunoglobulina-G de conejo conjugado con peroxidasa, Bio-Rad Laboratories) se diluyó en la misma solución 1/250 para PcOvo y 1/1000 para PcPV2. Se utilizó ABTS (Sigma Aldrich) como sustrato de la peroxidasa, cuya oxidación puede ser seguida colorimétricamente evidenciando de manera indirecta la presencia del antígeno. La absorbancia a 405 nm

fue medida en un lector de placas (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter, Inc.).

5.3.7. *Espectroscopía de absorción*

Con el objetivo de evaluar cuantitativamente las diferencias de color observadas durante la disección de las GA entre los grupos, se registraron los espectros de absorción de la fracción soluble de las mismas. Las condiciones de medida fueron las descritas en la sección 3.3.10. Se calculó la relación de absorbancia 509/280 nm como indicativo de la contribución relativa de PcOvo al espectro visible de la muestra.

5.3.8. *Cuantificación de la expresión génica de perivitelininas por q-PCR*

La PCR cuantitativa, o qPCR ("quantitative polymerase chain reaction" por sus siglas en inglés), permite cuantificar la cantidad inicial de un ADN copia específico (ADNc) (y por lo tanto la cantidad de ARNm que le dio origen) mediante la amplificación de ese material en sucesivas reacciones de PCR entre las cuales se detecta la acumulación del producto de amplificación gracias a la adición de, por ejemplo, una sonda fluorescente que se une al ADN doble cadena.

Los niveles de expresión de los genes de las perivitelininas PcOvo y PcPV2 fueron cuantificados por qPCR en los grupos V, C, PP y R.

5.3.8.1. Extracción de ARN y síntesis de ADNc

El proceso de extracción de ARN de las muestras se realizó bajo las condiciones necesarias para evitar la degradación de este ácido nucleico. La extracción de ARN se realizó con TRIzol®, que consiste en una solución de fenol e isotiocianato de guanidina. Éste disuelve los componentes celulares facilitando el aislamiento del ARN y a su vez mantiene la integridad de estas moléculas. Se partió de aproximadamente 15 mg de tejido para la homogeneización, siguiendo las especificaciones del fabricante, pero incluyendo algunas modificaciones al protocolo original: el pellet de ARN obtenido fue lavado tres veces con etanol en lugar de una, y para su resuspensión en agua libre de ARNasas fue incubado 30 min en hielo y 10 min a 56°C. La cantidad de ARN obtenida y su grado de pureza fue determinado espectrofotométricamente utilizando un

NanoDrop (Thermo Scientific), y su integridad y ausencia de contaminación con material genómico fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% teñido con bromuro de etidio. Por último se sintetizó el ADNc utilizando un kit comercial (Bio-Rad Laboratories), partiendo de 1 µg de ARN, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante e incluyendo un control negativo sin enzima.

5.3.8.2. Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores específicos para amplificar los genes de interés, *PcOvo* y *PcPV2*, partiendo de sus secuencias nucleotídicas (Sun et al. 2012b) y usando el software Primer 3 (Koressaar & Remm 2007, Untergasser et al. 2012) para *PcPV2*, y la herramienta Primer-BLAST (Ye et al. 2012) para *PcOvo*. Los cebadores obtenidos fueron evaluados utilizando la herramienta NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>), y su especificidad fue confirmada analizando el tamaño del producto de amplificación (amplicón) en una electroforesis en gel de agarosa 1%, y analizando las curvas de disociación en una reacción de qPCR. Se utilizaron los genes *GAPDH* y *ACTB* como genes de referencia luego de haber sido validados en las condiciones del presente experimento como se detalla en la sección 5.4.3. En la Tabla 5.1 se presentan las secuencias de los cebadores para los genes de interés así como para los genes utilizados en la validación y los que finalmente fueron seleccionados como referencia.

5.3.8.3. PCR cuantitativa

Las medidas de qPCR fueron realizadas en un equipo Stratagene® Mx3005P utilizando el kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Cada reacción se preparó en un volumen final de 10 µL, incluyendo 1 µL de ADNc, 5 µL de Supermix, 0,3 µL de solución de cebadores F+R 10 µM y 3,7 µL de agua estéril. El ciclado consistió en los siguientes pasos: 1 min a 95 °C, 40 ciclos de 10 seg a 95 °C, 30 seg a la temperatura de alineamiento específica para cada cebador (ver Tabla 5.1) y 30 seg a 60 °C. Luego de la etapa de ciclado, se adicionó 1 min a 95 °C y finalmente se desarrolló una curva de disociación de 55 a 95 °C.

Cada gen fue medido en la misma placa de 96 pocillos, incluyendo la curva estándar y el juego completo de muestras, lo cual ha sido demostrado como la mejor

opción en los casos donde se cuenta con un gran número de muestras (Hellemans et al. 2007). La curva estándar fue realizada partiendo de un conjunto de ADNc de distintos tratamientos sobre el cual se hicieron diluciones (1/5, 1/10, 1/50, 1/100 y 1/500). Para cada una de las muestras, se trabajó con una dilución 1/10 y en todos los casos, las mediciones se realizaron sobre tres réplicas técnicas. Finalmente, se incluyeron dos controles negativos, uno con agua estéril en lugar de molde (NTC: "no template control") y otro con el control negativo de la retrotranscripción en lugar de molde (NRT "no retrotranscription control"). Se calculó la eficiencia de cada par de cebadores a partir de la pendiente de la recta ajustada entre los puntos de la curva estándar.

5.3.8.4. Validación de genes de referencia

En el caso de la cuantificación relativa del ARNm para los genes de interés, la estrategia más ampliamente aceptada consiste en evaluar sus niveles de expresión en términos relativos a genes que no varíen su grado de expresión en las mismas condiciones experimentales. Estos genes se denominan "genes de referencia" y su expresión constante debe ser confirmada para cada caso, ya que ésta puede variar según la especie en estudio, el órgano, e incluso según los tratamientos. Por este motivo, la validación de los genes de referencia es un paso necesario para obtener un resultado confiable en un estudio de expresión génica. Así mismo, actualmente es considerado como información esencial que debe ser incorporada en cualquier trabajo según la guía de información mínima para experimentos de q-PCR (Bustin et al. 2009).

Se realizó una revisión bibliográfica sobre trabajos publicados en el phylum donde se hubieran validado genes para ser utilizados como referencia de expresión para análisis de qPCR. Se seleccionaron como candidatos aquellos que hubieran sido validados un mayor número de veces (*EF1-a*, *ACTB*, *TUBB*, *18SRNA*, *RPL7*, *His H3.3* y *GAPDH*) y se diseñaron cebadores específicos para *P. canaliculata*. Para *18S* y *ACTB* se utilizaron los cebadores publicados por Xu et al. (2014) y Zeng et al. (2012) para la especie, para *EF1-a* se diseñaron a partir de información genómica depositada en Gen Bank (Nº acceso AB629961.1 Matsukura, Wada y Okuda), y para los restantes se utilizó información transcriptómica (Sun et al. 2012a). Se utilizó el software Primer 3 v.4.0.0 y v.0.4.0 para el diseño de los cebadores y Net-Primer (PREMIER Biosoft) para la evaluación de las secuencias obtenidas. En la Tabla 5.1 se presenta la secuencia de los cebadores utilizados.

Se midió la expresión de cada uno de los candidatos a genes de referencia utilizando todas las muestras del experimento de expresión de las perivitelininas de interés y siguiendo las mismas condiciones metodológicas descritas. La evaluación del grado de estabilidad de cada uno de los genes incluidos en el estudio se determinó aplicando tres herramientas de análisis: geNorm (Vandesompele et al. 2002), el método comparativo de ΔCt (Silver et al. 2006) y NormFinder (Andersen et al. 2004). El método geNorm calcula para cada gen un parámetro de estabilidad M que es inversamente proporcional al nivel de estabilidad de cada gen y el parámetro V que indica el número óptimo de genes que, dentro del orden de estabilidad indicado, deberían usarse como referencia. El método comparativo de ΔCt calcula el valor de estabilidad de un gen candidato como el desvío estándar de las diferencias de Ct entre éste y cada uno de los restantes. Como resultado también se obtiene un orden de estabilidad para los genes evaluados. Tanto geNorm como el método comparativo de ΔCt son "métodos de comparaciones de pares" ya que establecen el grado de estabilidad de un gen dado en base a la comparación relativa con otro candidato. Se basan en el concepto de que la diferencia de expresión entre un buen par de genes de referencia no debería mostrar variaciones en todo el conjunto de datos evaluados, independientemente del tratamiento, motivo por el cual considera todo el conjunto de datos sin discriminación alguna. Por último, NormFinder evalúa las diferencias sistemáticas en la expresión que puedan existir entre las distintas condiciones experimentales evaluadas (diferencias entre tratamientos), sumada a las diferencias de expresión entre las muestras de un mismo tratamiento, para asignar un valor de estabilidad a cada gen candidato.

Tabla 5.1. Información referida a los cebadores y sus productos de amplificación.

Nombre del gen	Abreviatura	Cebador <i>forward</i> (F) y <i>reverse</i> (R)	Longitud del amplicón (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
Perivitelina 1 de <i>P. canaliculata</i>	<i>PcOvo</i>	F: GTGGCTACATCCCTGTTGCT	154	55
		R: CCCTGAACGAGTGCTTGACT		
Perivitelina 2 de <i>P. canaliculata</i>	<i>PcPV2</i>	F: GGTGTTGGGCAAGTTGATGT	183	53
		R: ACGAGAAGAGAAACGGGTGT		
Factor de elongación 1-a	<i>EF1-a</i>	F: AGAACTGGGCTGTGTGGTTT	234	59
		R: GGAGATTGGCACAAAAGGAA		
Proteína ribosomal L7	<i>RPL7</i>	F: CTGCCGAGAAAGAAACACAA	181	58
		R: ATGGTGGATGGAGGAGAAAG		
Histona H3.3	<i>His H3.3</i>	F: CGTGAAATTGCACAGGACTT	163	58
		R: ATGCCACAAATGCTACAAGC		
β -tubulina	<i>TUBB</i>	F: TGTGCCGTCTCCAAAGGTAT	176	59
		R: GGTGGTTGAGGTCTCCGTAA		
ARN de la subunidad 18S	<i>18S RNA*</i>	F: TGATCCTGCCAGTAGTCAT	146	52
		R: TTGCCACAGTTATCCAAG		
β -actina	<i>ACTB**</i>	F: TCACCATTGGCAACGAGCGAT	87	56
		R: TCTCGTGAATACCAGCCGACT		
Gliceradehído 3-fosfato deshidrogenasa	<i>GAPDH</i>	F: CAACCTCAAAACCGATGCCA	184	55
		R: GACAAAGCGATTAGTCAGTGGA		

* Tomado de Zheng, 2012. ** Tomado de Xu, 2014. La secuencia de los cebadores se expresa de 5' a 3'.

5.3.9. Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos para todas las variables analizadas fueron evaluadas por test de análisis de la varianza (ANOVA) y aplicando el test a posteriori de Bonferroni. Algunas variables fueron transformadas por falta de homocedasticidad (Test de Levene $p < 0.05$) y cuando la transformación no fue aplicable, se llevó a cabo un test no paramétrico de análisis de la varianza de Kruskal-Wallis, seguido de test de Dunn. Por último, la asociación entre pares de variables fue evaluada mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

5.4. Resultados

5.4.1 Datos morfológicos

El largo total, el peso completo y el peso de las partes blandas (excluyendo la GA) no variaron entre los grupos de hembras (Tabla 5.2), mientras que el peso medio de la GA sí mostró una variación significativa entre los grupos (Fig. 5.2 A). Como consecuencia, el peso del órgano relativo a la masa corporal (g GA/g partes blandas) mostró también diferencias significativas entre los grupos (Fig. 5.2 B). Por otro lado, se observó una correlación negativa entre el peso de la GA y el peso de la masa total de huevos depositada por cada hembra (Fig. 5.2 C). El peso de las puestas fue decreciendo a lo largo de los eventos de oviposición sucesivos (Fig. 5.2 D). En la Tabla 5.3 se muestra la masa total de huevos depositada por cada grupo de hembras como un indicador del esfuerzo reproductivo. Si bien el test de comparaciones múltiples a posteriori de Bonferroni no halló diferencias significativas entre los grupos R y PE, cabe destacar que el valor de p del test fue cercano al límite ($p = 0,051$).

Tabla 5.2. Datos morfológicos para cada grupo de hembras.

	V	C	PP	R	PE	I
Largo total (mm)	42,8 ± 1,7	45,5 ± 1,6	45,4 ± 2,7	44,1 ± 2,5	45,7 ± 1,1	46,1 ± 2,2
Peso total (g)	17,9 ± 2,2	19,7 ± 2,5	20,9 ± 2,7	18,4 ± 2,9	21,3 ± 1,0	22,7 ± 4,1
Peso de las partes blandas (g)	7,3 ± 0,9	7,6 ± 1,1	7,9 ± 1,5	7,9 ± 1,2	8,1 ± 0,6	8,9 ± 0,8

Los valores gravimétricos corresponden al peso húmedo. El peso de las partes blandas no incluye la GA.

En todos los casos los valores indican promedio ± DE. $p > 0,097$. $n = 33$.

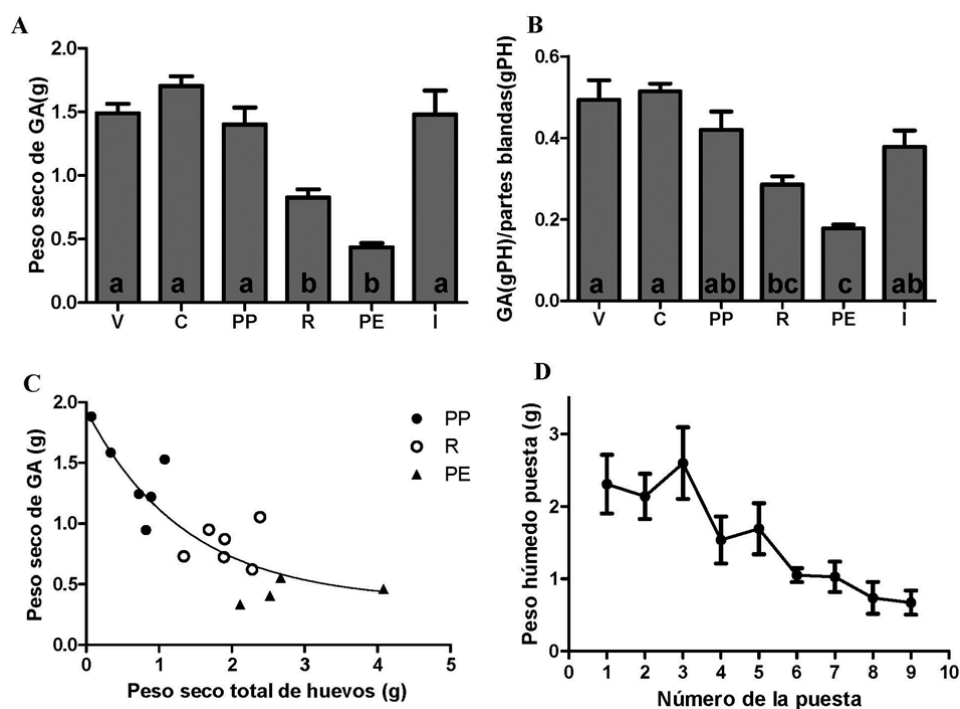


Figura 5.2. A) Variación en el peso seco de la GA. $p < 0,001$. $n = 32$. B) Peso de la GA relativo a la masa corporal referido a peso húmedo $p < 0,001$. $n = 32$. Barras y barras de error indican media y EEM, respectivamente. Las mismas letras indican ausencia de diferencias significativas entre grupos. C) Correlación entre el peso seco de la GA y la masa total de huevos depositada por cada hembra. Coeficiente de correlación de Pearson = $-0,806$, $p < 0,05$. Ajuste exponencial $R^2 = 0,766$. D) Variación en el peso de las puestas en función del número de evento de oviposición (se agruparon los datos de los grupos experimentales PP, R y PE). Los puntos y las barras de error indican media y EEM, respectivamente.

Tabla 5.3. Número de puestas y biomasa total de huevos depositados por cada grupo de hembras.

	PP	R	PE
Número de puestas	1,00	3,33 ± 1,03	8,25± 2,36
Biomasa total de huevos (g PS)	0,65 ± 0,38 (a)	1,91 ± 0,38 (b)	2,85 ± 0,86 (b)
N	6	6	4

Los valores indican promedio ± DE. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre los grupos.

5.4.2. Niveles de los principales componentes de secreción de la GA

Mientras el contenido de humedad de la GA mostró un incremento significativo entre los grupos R y PE, probablemente asociado a los eventos de oviposición (Fig. 5.3 A), los niveles de proteínas y polisacáridos en el órgano mostraron un descenso significativo en el grupo PE (Fig. 5.3 B, C). Con respecto al contenido de calcio, el calcio total presentó un nivel estable entre los distintos tratamientos, sin diferencias significativas entre los distintos grupos de hembras ($X^2_5 = 4,815$; $p=0,439$; $n=33$) y los niveles de calcio soluble mostraron una diferencia significativa entre los grupos R e I, pero no se encontraron diferencias entre grupos de hembras con distinto esfuerzo reproductivo (Fig. 5.3 D).

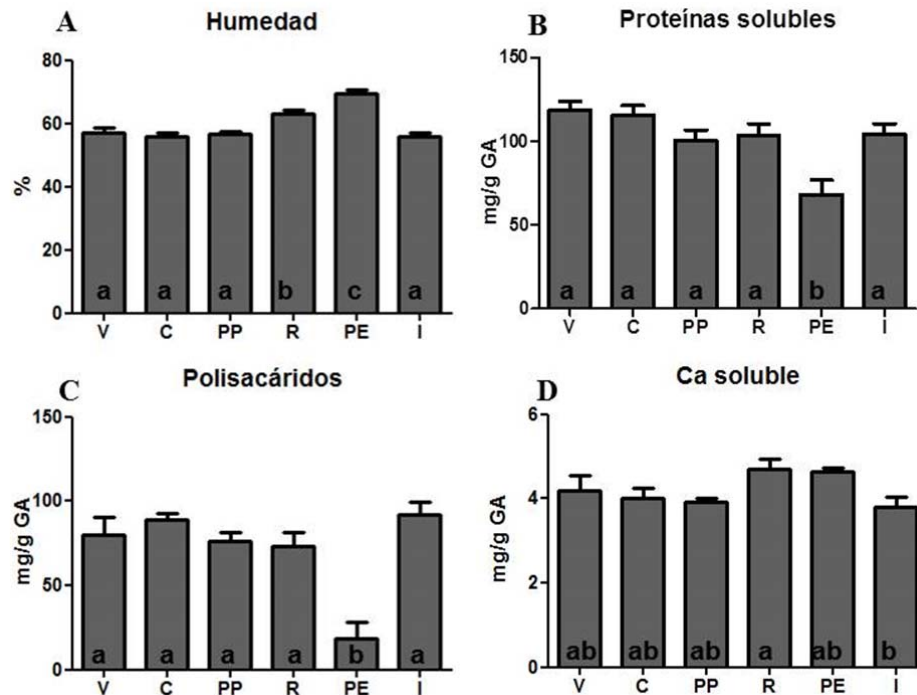


Figura 5.3. Niveles de los principales componentes de secreción de la GA. Los valores se expresan como mg/g de peso seco de GA. **A)** $p < 0,001$. $F_{5,26} = 20,568$. $n = 32$ **B)** $p < 0,001$. $F_{5,27} = 6,532$. $n = 33$ **C)** $p < 0,001$. $F_{5,22} = 7,270$. $n = 28$ **D)** $p = 0,050$. $F_{5,27} = 2,574$. $n = 32$. Las barras y las barras de error indican promedio y EEM, respectivamente. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre los grupos.

5.4.3. Validación de genes de referencia y su empleo en la normalización de datos de expresión génica

Los niveles de expresión de los candidatos a genes de referencia se muestran en la figura 5.4. La Tabla 5.4 muestra el ranking de estabilidad generado por los algoritmos aplicados y se indica para cada caso su respectivo valor de estabilidad. De acuerdo con el resultado arrojado por geNorm, el orden de estabilidad resultante, en sentido decreciente, es: *RPL7*, *GAPDH*, *18S RNA*, *ACTB*, *His H3.3*, *EF1- α* , *TUBB*, evidenciado por el valor creciente del parámetro M (Fig. 5.5). El número óptimo de genes de referencia a ser usados en la normalización de acuerdo con esta herramienta de análisis es 3 (Fig. 5.5). Para este algoritmo, *RPL7*, *GAPDH* y *18S RNA* representan la mejor combinación de genes para el cálculo del factor de normalización. Empleando el método comparativo de ΔC_t , el orden de estabilidad es muy semejante: *GAPDH*, *RPL7*, *18S RNA*, *ACTB*, *His H3.3*, *EF1- α* y *TUBB*. Este análisis no indica cuál es el número

óptimo de genes a ser usados como referencia. Por último, la herramienta de cálculo NormFinder indica que *GAPDH* y *ACTB* representan la mejor combinación de genes para ser usados en la normalización.

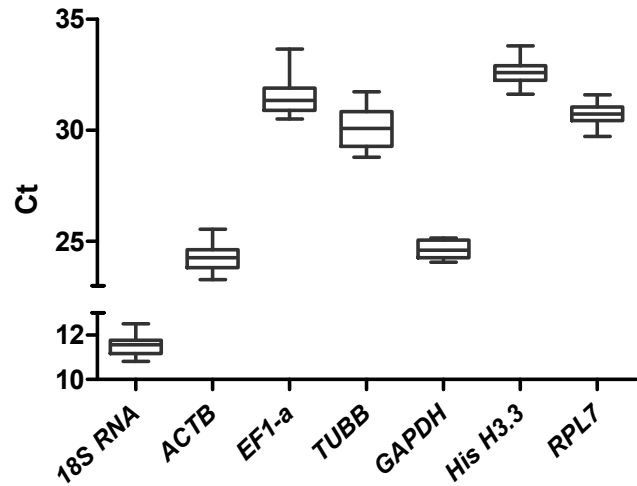


Figura 5.4. Niveles de expresión de los candidatos a genes de referencia evaluados. Se grafican los rangos de Ct obtenidos ("Cycle threshold") en la qPCR como 25 -75 percentiles (cajas), medias (líneas) y rangos (barras).

Tabla 5.4. Orden de estabilidad de expresión dada por las distintas herramientas de cálculo.

	geNorm		Método comparativo de ΔCt		NormFinder	
1°	<i>RPL7</i>	0,47	<i>GAPDH</i>	0,70	<i>GAPDH</i>	0,07
2°	<i>GAPDH</i>	0,48	<i>RPL7</i>	0,72	<i>ACTB</i>	0,10
3°	<i>18S RNA</i>	0,50	<i>18S RNA</i>	0,73	<i>RPL7</i>	0,12
4°	<i>ACTB</i>	0,54	<i>ACTB</i>	0,77	<i>HisH3.3</i>	0,13
5°	<i>HIS H3</i>	0,59	<i>HIS H3</i>	0,77	<i>18S RNA</i>	0,17
6°	<i>EF1-a</i>	0,69	<i>EF1-a</i>	0,98	<i>EF1-a</i>	0,22
7°	<i>TUBB</i>	0,77	<i>TUBB</i>	1,07	<i>TUBB</i>	0,28

Los valores representan la estabilidad de cada gen de acuerdo con cada algoritmo: valor M, promedio del desvío estándar y valor de estabilidad de acuerdo con geNorm, método ΔCt comparativo y NormFinder, respectivamente.

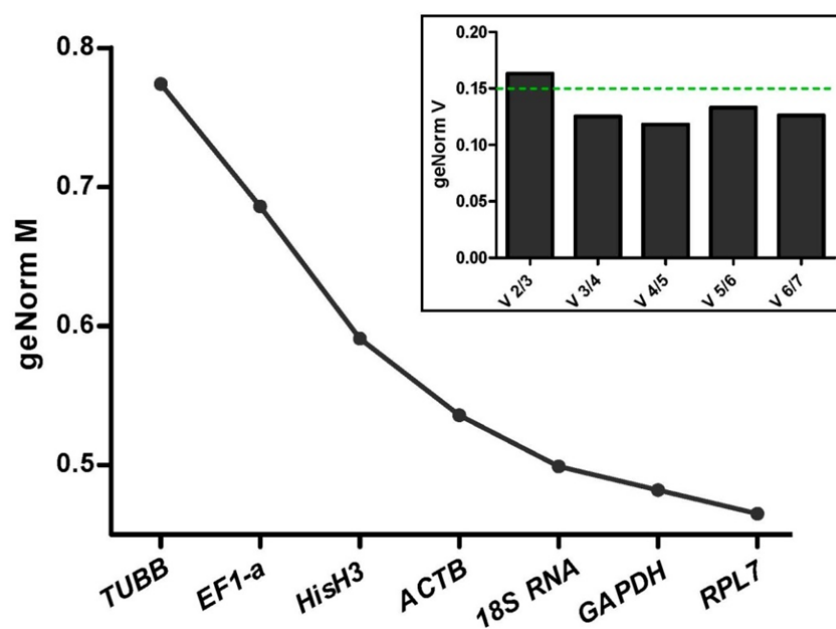


Figura 5.5. Valor M dado por geNorm para los candidatos a genes de referencia evaluados. El recuadro muestra el valor V para cada combinación $V_n/n+1$. El límite del valor V sugerido se muestra como una línea de puntos.

5.4.4. Almacenamiento y niveles de expresión de *PcOvo* y *PcPV2* en la GA

La cantidad de *PcOvo* y *PcPV2* almacenada en la GA, cuantificada por ELISA, mostró un descenso significativo en el grupo PE (Fig. 5.6 A, B), especialmente evidente en el caso de *PcOvo* donde el nivel de la perivitelina disminuyó hasta la mitad del valor inicial observado en las hembras vírgenes (grupos V e I). Con respecto a los niveles de expresión de *PcOvo* y *PcPV2* medidos por qPCR, ambos genes mostraron una sobreexpresión en el grupo R, que prácticamente se duplicó y triplicó, respectivamente, desde un nivel basal presente en los grupos V, C y PP (Fig. 5.6 C y D).

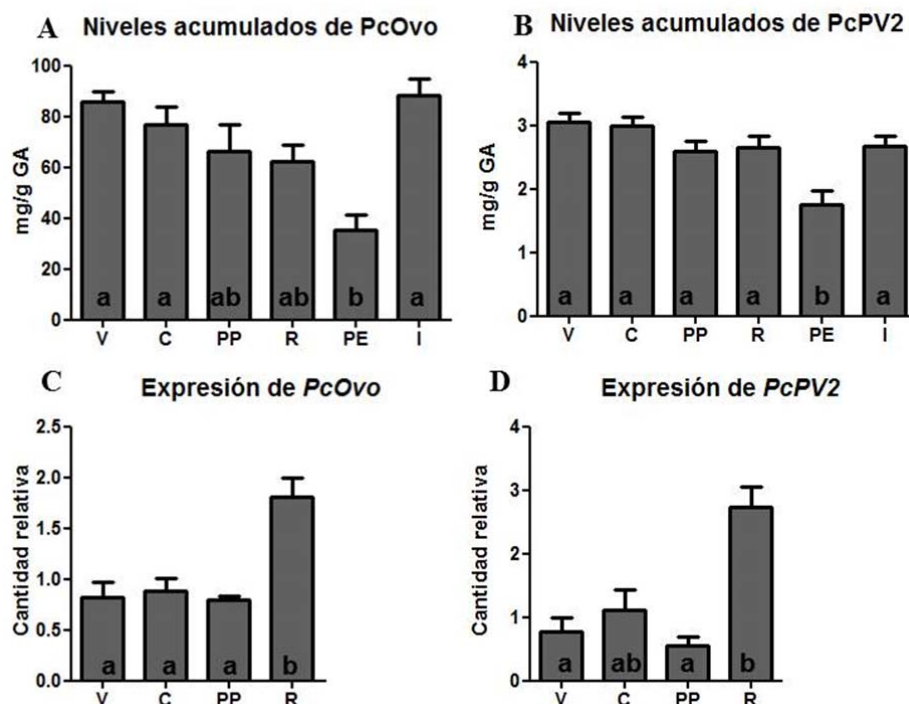


Figura 5.6. Almacenamiento y expresión génica de las perivitelinas PcOvo y PcPV2 en la GA. **A)** Niveles acumulados de PcOvo. $p < 0,001$. $F_{5,27} = 5,972$. $n=33$ **B)** Niveles acumulados de PcPV2. $p < 0,001$. $F_{5,27} = 6,661$. $n=33$. Los valores expresan mg de perivitelina/ g de peso seco de GA **C)** Niveles de expresión de *PcOvo*. $p < 0,002$. $n=20$ **D)** Niveles de expresión de *PcPV2*. $p < 0,001$ $n=20$. Los valores absolutos son arbitrarios y relativos a la curva estándar. Las barras y las barras de error indican promedio y EEM, respectivamente. Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre los grupos.

Con respecto a los datos de qPCR, la eficiencia en la amplificación de los genes analizados en este estudio se mantuvo entre un 90 y un 110%, valor que se calculó de la pendiente de la recta ajustada sobre la curva estándar para cada gen, donde el r^2 del ajuste fue siempre mayor a 0,9. El producto de amplificación de cada gen mostró una única banda del tamaño esperado en geles de agarosa, indicando una amplificación específica (Fig. 5.7), lo cual fue confirmado por el análisis de las curvas de disociación. Para la normalización de la expresión de los genes de interés, entre las tres opciones obtenidas en la validación de genes de referencia (ver sección 5.4.3), se seleccionaron los genes *GAPDH* y *ACTB* ya que sus niveles de expresión fueron los más cercanos al de los genes de interés (Fig. 5.8). Esta condición aumenta la sensibilidad en los ensayos de qPCR (Silver et al. 2006).

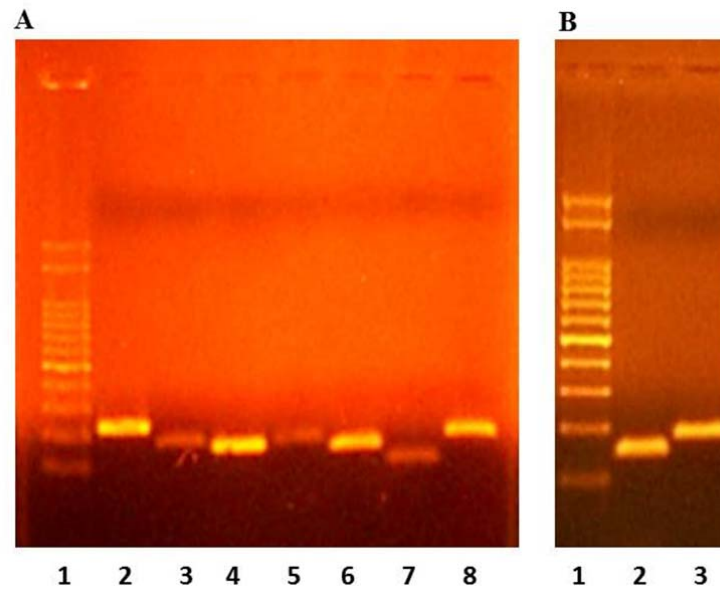


Figura 5.7. Gel de agarosa 1%. **A)** Productos de amplificación de los candidatos a genes de referencia evaluados. Calle 1: Ladder 100pb Productos Bio-Lógicos. Calles 2-8: *EF1-a*, *RPL7*, *His H.3*, *TUBB*, *18S RNA*, *ACTB*, *GAPDH*, respectivamente. **B)** Productos de amplificación de los genes de interés. Calle 1: Ladder 100pb Productos Bio-Lógicos. Calles 2 y 3: *PcOvo* y *PcPV2*, respectivamente.

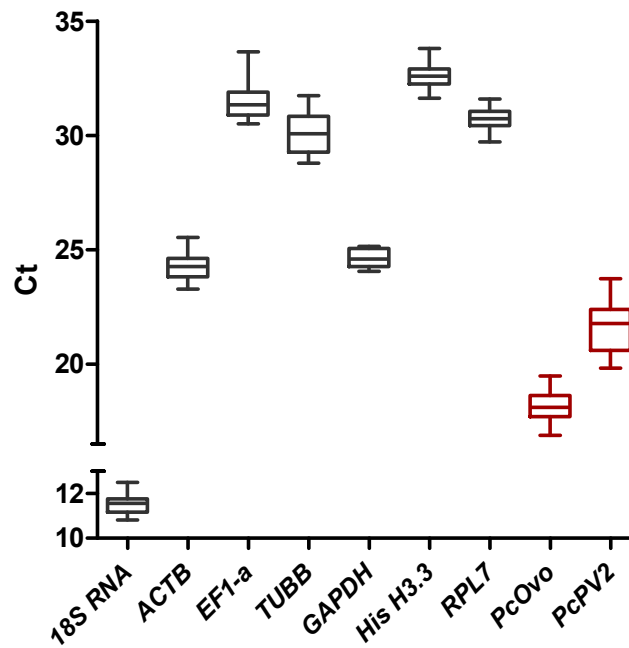


Figura 5.8. Comparación de los niveles de expresión de *PcOvo* y *PcPV2* con los distintos candidatos a genes de referencia evaluados.

5.4.5. Análisis de la coloración del órgano

Las GA de las hembras del grupo PE presentaron un color notoriamente más pálido que las GA de hembras de los grupos restantes (Fig. 5.9).

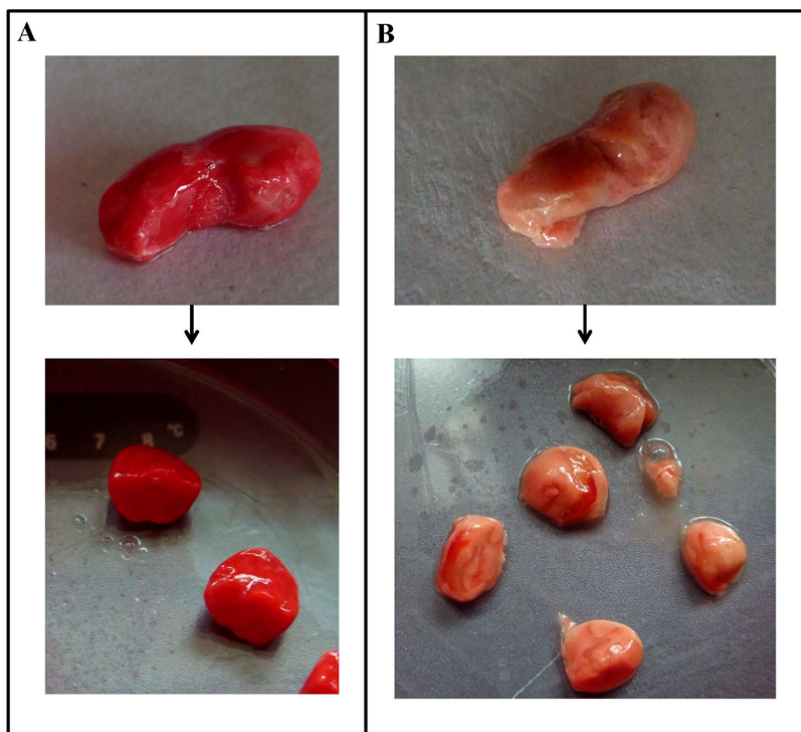


Figura 5.9. Diferencias en el aspecto de la GA de hembras del grupo PE respecto de las restantes. **A)** GA representativa de las hembras de los grupos V, C, PP, R e I. **B)** GA representativa de hembras del grupo PE.

Para contar con un parámetro cuantitativo contrastable estadísticamente se tomaron los espectros de absorción UV-visible de la fracción soluble del órgano, los cuales mostraron el mismo perfil independientemente del grupo de hembras. Cuando fueron normalizados por la absorbancia a 280 nm, se observó una diferencia en intensidad en la región visible del espectro (Fig. 5.10). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

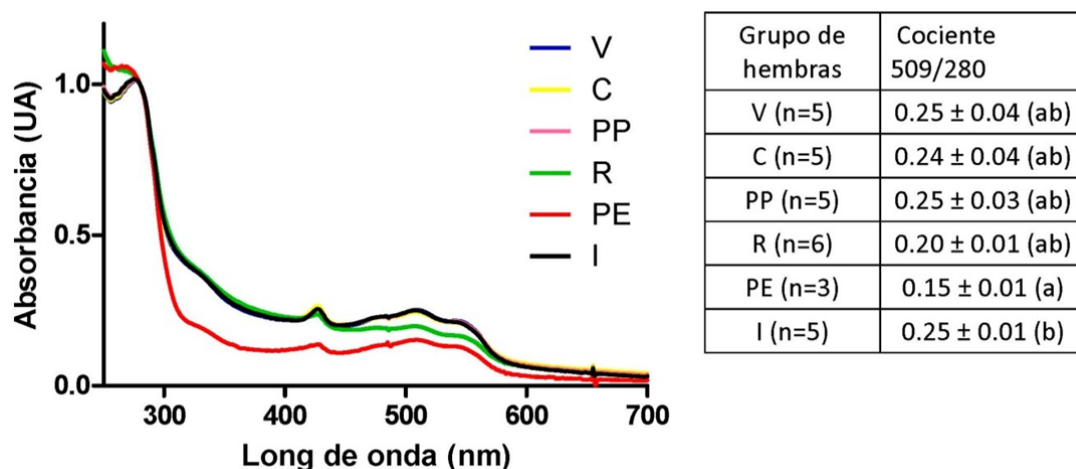


Figura 5.10. Promedio de los espectros normalizados a 280 nm para cada grupo de hembras. Los espectros de los grupos V, C, PP e I se encuentran superpuestos. Se muestra el cociente 509/280 nm para cada grupo. Las letras iguales indican ausencia de diferencias significativas entre los grupos.

5.5. Discusión

5.5.1. Efecto de la actividad reproductiva y del esfuerzo reproductivo sobre la fisiología de la GA

En la presente sección se evaluaron algunos procesos fisiológicos y metabólicos de la GA con el objeto de ayudar a explicar la notable fecundidad de la especie, e identificar factores limitantes del rendimiento reproductivo.

Para evaluar el efecto del esfuerzo reproductivo se definieron tres grupos de hembras de acuerdo con el número de puestas depositadas: PP, R y PE, con un esfuerzo reproductivo bajo, intermedio y alto, respectivamente. El grupo R adicionalmente permitió evaluar la presencia de un período de recuperación entre sucesivas oviposiciones. Por otro lado, el efecto de la cópula pudo ser evaluado con las hembras del grupo C, mientras que las del grupo V fueron consideradas como un grupo de referencia sin actividad reproductiva y con un esfuerzo reproductivo nulo.

Todos los componentes bioquímicos de secreción analizados (polisacáridos, proteínas solubles y las principales perivitelininas) mostraron en el grupo PE un descenso en sus niveles acumulados, es decir, luego de un esfuerzo reproductivo alto, reflejando la movilización de estos componentes hacia los huevos. Por otro lado, como un indicador del grado de inversión de las hembras en la reproducción, la biomasa total de huevos depositada por una hembra del grupo PE prácticamente duplicó la biomasa de la

GA de una hembra del grupo V (en base a su peso seco). Es decir, que detrás de la liberación de los componentes de secreción, existe necesariamente una recuperación rápida de los mismos para hacer frente a un esfuerzo reproductivo alto, lo cual implica una importante capacidad biosintética del órgano.

Con respecto a los estímulos y/o las condiciones asociadas a la reproducción que pudieran estimular la biosíntesis en la GA, las perivitelinas PcOvo y PcPV2 duplicaron y triplicaron sus niveles de transcripción en el grupo R respecto al grupo V, respectivamente. La cópula no estimuló la síntesis de perivitelinas pero sí lo hizo la oviposición luego de un esfuerzo reproductivo intermedio. La sobreexpresión de las perivitelinas, luego de la oviposición, sugiere la existencia de un proceso de recuperación de estos componentes en el órgano, de manera similar a como fue observado para los principales componentes de FPV en la GA del pulmonado *Lymnaea stagnalis* (Wijsman & Wijck-Batenburg 1987). Este fenómeno pudo ser verificado para las perivitelinas PcOvo y PcPV2 a nivel transcripcional, que es un punto de regulación importante de la vía de expresión de proteínas. Sin embargo sería necesario profundizar el análisis para determinar si existen otros puntos de regulación implicados, además del transcripcional, en esta misma etapa o en asociación con otros estímulos y/o condiciones reproductivas. Incluso, sería importante determinar si este período de recuperación es importante para los restantes componentes de secreción del órgano.

En concordancia con los resultados de expresión génica, las perivitelinas almacenadas no mostraron un descenso significativo entre los grupos PP y R, en los cuales las hembras depositaron 1 y 3 (en promedio) masas de huevos, respectivamente. En otras palabras, frente a un esfuerzo reproductivo bajo e intermedio, tal como fueron definidos para este estudio, el proceso de recuperación de las perivitelinas parece eficiente. Sin embargo, luego de un esfuerzo reproductivo alto, el órgano no recuperó su potencialidad reproductiva inicial, lo cual es de todos modos destacable considerando que las hembras del grupo PE depositaron 5811 ± 1746 huevos durante el período estudiado (estimado a partir del peso de las puesta de acuerdo con Tamburi y Martin (2011)). Dado que el mismo comportamiento fue observado para las proteínas y los polisacaridos, con un descenso significativo en sus niveles acumulados entre los grupos V y PE, la biosíntesis parecería ser un factor limitante para el rendimiento reproductivo de la especie. En este mismo sentido, a lo largo de los sucesivos eventos de oviposición, el peso de las puestas y la variabilidad en este parámetro mostraron un descenso. Es

decir que durante un esfuerzo reproductivo alto, las hembras reducen el número de huevos por puesta.

A partir de la masa total de huevos depositada por las hembras y considerando que su composición cuali- cuantitativa de nutrientes por huevo no varía entre eventos sucesivos de oviposición (Frassa 2011, Tamburi & Martín 2011), se pudo estimar la cantidad total de proteínas y polisacáridos. Para esto utilizamos los datos disponibles en la bibliografía de la composición bioquímica de huevos de *Pomacea* (Giglio et al. 2016, Heras et al. 1998).

Nuevamente, los datos también apoyan la existencia de una recuperación de los componentes bioquímicos en el órgano, ya que los niveles iniciales de proteínas y polisacáridos en la GA de hembras del grupo V fueron cerca de 2 y 8 veces, respectivamente, más bajos que la cantidad total invertida en los huevos por hembras del grupo PE.

A diferencia de las proteínas y polisacáridos, la cantidad de calcio total acumulada en la GA de las hembras del grupo V fue equivalente a la cantidad invertida en los huevos por las hembras del grupo PE. Sin embargo, a pesar de que la cantidad inicial en el órgano parece haber sido suficiente para abastecer la demanda impuesta por la oviposición, un proceso de recuperación aparece también implicado en el caso del calcio total, ya que sus niveles fueron constantes en la GA de las hembras independientemente del esfuerzo reproductivo. Los niveles de calcio soluble también se mantuvieron constantes independientemente del esfuerzo reproductivo. Es decir que, bajo las condiciones experimentales del presente estudio, con disponibilidad de calcio y de alimento ilimitado, la GA mostró una capacidad diferencial para recuperar sus componentes de secreción, identificándose a la biosíntesis como un posible factor limitante ante un esfuerzo reproductivo alto.

La ausencia de diferencias significativas en el peso de las partes blandas (excluyendo la GA) entre los distintos grupos estudiados sugiere, como sería de esperar para organismos que depositan grandes cantidades de huevos, que la recuperación de los componentes de secreción está sustentada principalmente por los nutrientes provenientes de la dieta, los cuales son direccionados hacia la gónada, sin un paso previo de acumulación/removilización en tejidos somáticos (Eckelbarger 1994). En este sentido, existen diversos trabajos en *P.canaliculata* que sustentan esta hipótesis y que se resumen a continuación. Por un lado, las hembras muestran un rendimiento reproductivo mayor cuanto mayor es la disponibilidad de alimento (Albrecht et al.

1999, Estoy et al. 2002), mientras que la actividad de oviposición declina durante períodos de ayuno, mostrando una rápida recuperación en cuanto se restituye el suministro de alimento (Tamburi & Martín 2016). A su vez, las hembras presentan una tasa de ingestión 50% mayor que machos de la misma talla (Tamburi & Martín 2009).

Con respecto al color más pálido y la menor turgencia observada en las hembras del grupo PE (Fig. 5.10), resulta consistente con el mayor contenido de humedad observado para este grupo. Aunque no se registraron diferencias significativas, el cociente de absorbancias 509/280 mostró una disminución entre los grupos R y PE, siguiendo la misma tendencia registrada visualmente. Cabe destacar que en las hembras silvestres es frecuente observar variaciones en la coloración de las GA desde un rosado intenso (fucsia) hasta un rosado pálido, o incluso amarronado (observación personal). Considerando los resultados aquí presentados, sería interesante determinar, a través de un muestreo más amplio, si el cociente de absorbancias 509/280, asociado al contenido de carotenoproteínas, puede efectivamente vincularse con el esfuerzo reproductivo que experimentan las hembras, lo cual podría representar un parámetro de utilidad para evaluar la historia reproductiva de las hembras en un momento dado en la población. Alternativamente, medir la reflectancia de la GA podría ser un complemento útil en este sentido (Frassa 2011).

Con respecto al grupo de hembras I, no mostraron diferencias con respecto al grupo V en ninguna de las variables analizadas. La heterogeneidad en el comienzo de la actividad reproductiva que representarían estos dos grupos de hembras no pudo ser explicada en base a los niveles de los distintos componentes de secreción acumulados en la GA, por lo cual sería necesario un análisis más profundo que incluyera el ovario y/o sus factores de regulación neuroendócrinos para comprender este fenómeno.

5.5.2. Validación de genes de referencia en la GA de *Pomacea canaliculata*

En el caso de *P. canaliculata* no existen trabajos donde se evalúe la estabilidad de expresión de genes para ser empleados en la normalización de datos de qPCR, por lo cual fue necesario incorporar al presente estudio una validación de genes de referencia. El orden de estabilidad obtenido para los genes evaluados fue consistente entre los distintos métodos de análisis aplicados, especialmente en lo que respecta a los genes de mayor y menor estabilidad (Tabla 5.4). Las discrepancias encontradas probablemente estén relacionadas con las diferencias en los cálculos aplicados a una misma serie de

datos. Considerando que en el caso de geNorm, los candidatos con una mínima diferencia en expresión entre muestras no son bien puntuados (Andersen et al. 2004), podría ser el motivo por el cual en nuestro análisis este algoritmo no asignó un buen valor de estabilidad a *ACTB* en comparación con NormFinder. Esta es una discrepancia comúnmente observada en trabajos de validación de genes de referencia que de hecho fue experimentalmente evaluada y justificada por los autores de NormFinder (Andersen et al. 2004). Con respecto a los genes menos estables, las tres herramientas de cálculo indican que *EF1-a* y *TUBB* fueron los genes menos estables. El caso de *EF1-a* resultó llamativo ya que fue el candidato validado en el mayor número de trabajos de genes de referencia en moluscos, sin embargo, en las condiciones experimentales del presente trabajo, no mostró la estabilidad esperada y definitivamente no puede ser considerado un buen gen para la normalización de los datos.

La validación de genes de referencia del presente estudio, es el primer análisis de este tipo en *P. canaliculata* y fue llevado a cabo en un órgano clave para la reproducción. Esta información representa un buen punto de partida para estudios de expresión de genes vinculados con la reproducción en una especie altamente invasiva, plaga y vector de parasitosis. Si bien para el presente estudio se utilizaron *GAPDH* y *ACTB* para la normalización, se validaron otros genes de expresión estable con distintos niveles de expresión, que pueden resultar útiles como alternativa para estudios que incluyan genes de interés con grados de expresión mayores o menores a los medidos en este trabajo. Asimismo, demostramos que la expresión de *PcOvo* y/o *PcPV2* podría ser utilizada para evaluar factores que pudieran afectar la fecundidad de la especie. Esto podría llegar a tener relevancia en zonas donde la especie fue introducida, para el control de la plaga, así como en su ambiente nativo, como bioindicador de contaminantes ambientales, siendo que acumulan metales pesados en sus tejidos, entre ellos en la GA y se considera que podría utilizarse como especie centinela (Hayes et al. 2015). A su vez, la validación de genes de referencia puede ser una valiosa información básica para futuros estudios de expresión génica en otras especies de ampuláridos.

6.

Conclusiones generales

De acuerdo con los resultados obtenidos se destacan las siguientes conclusiones:

- Las perivitelinas PcOvo y PcPV2 almacenadas en la GA de *P. canaliculata* no están sujetas a modificaciones estructurales adicionales antes de ser incorporadas a los huevos. Esta es la primera evidencia en gasterópodos que sugiere que aquellos con GA tendrían un proceso alternativo, aunque funcionalmente análogo a la vitelogénesis, aunque en esta última los precursores están sujetos a grandes cambios estructurales durante su maduración.
- Las perivitelinas PcOvo y PcPV2 de la GA poseen las mismas propiedades tóxicas, antinutritivas y antidigestivas que los huevos, siendo por lo tanto nocivas para los depredadores. Esto representa la primer explicación del llamativo comportamiento de descarte del órgano que exhiben los depredadores de adultos de la especie.
- El consumo de hembras de *P. canaliculata* por los depredadores representa una desventaja energética, ya que el contenido energético de las partes blandas consumidas es menor al de los machos. Sin embargo, al menos en el caso del gavián caracolero, se determinó que esto no lleva a una depredación preferencial hacia los machos.
- La actividad reproductiva de oviposición, pero no la de cópula, induciría un aumento del nivel de expresión y biosíntesis de las principales perivitelinas en la GA. En base a esto, podría considerarse que las hembras transitan por un período de recuperación de los componentes de secreción entre eventos de oviposición, siendo capaces de sustentar un alto esfuerzo reproductivo por restitución de los principales componentes secretados hacia los huevos (proteínas, polisacáridos y calcio).
- La GA de *P. canaliculata* mostró una capacidad diferencial para recuperar sus componentes de secreción bioquímicos e inorgánicos. Se identificó a la biosíntesis como un posible factor limitante de la oviposición a largo plazo.

- Se llevó a cabo el primer análisis de estabilidad de genes de referencia en *P. canaliculata*, en un órgano clave para su reproducción. A su vez esto representa una herramienta de utilidad para futuros estudios de expresión génica en otras especies de ampuláridos.
- Se identificó la expresión de *PcOvo* y/o *PcPV2* como un posible marcador para evaluar factores que afecten la fecundidad de *P. canaliculata*.

7.

Consideraciones finales

El estudio de las diversas estrategias reproductivas de moluscos muestra que la mayoría de los gasterópodos ha adquirido glándulas accesorias en el tracto reproductor femenino que permitieron la centralización de muchas de las funciones reproductivas en un órgano especializado. Esto tal vez haya significado la complejización de los procesos fisiológicos y bioquímicos que allí se llevan a cabo, y colaborado en la enorme diversificación de este grupo, el más especioso de los animales luego de los insectos. De acuerdo con los resultados del presente trabajo, se demuestra que las perivitelinas se sintetizan de manera directa en la GA, sin intermediarios inmaduros ni la participación de otros órganos, y coordinada con la actividad reproductiva. Eckelberger (1994) destaca el rol central de los mecanismos vitelogénicos en el éxito de una especie en un determinado hábitat, siendo que refleja su capacidad de respuesta ante los nutrientes disponibles. En el caso de *P. canaliculata* cerca del 90% de la energía asimilada es destinada directamente a la reproducción, sin acumulación somática, un valor particularmente alto en comparación con otros gasterópodos (Estoy et al. 2002), y que se traduce en la alta fecundidad de esta especie. En este contexto, el mecanismo de perivitelogénesis de estos gasterópodos representa una alternativa más eficiente que la vitelogénesis del resto de los invertebrados, lo cual podría haber contribuido al éxito evolutivo del grupo en el caso de los ampuláridos. Sería necesario ampliar el estudio de la estructura-función de perivitelinas incluyendo gasterópodos con diferentes estrategias de oviposición para confirmar esta suposición. Dentro de la familia Ampullariidae, la profundización del estudio de las estrategias reproductivas con un enfoque comparativo-evolutivo y a nivel molecular sería valiosa considerando la importancia que tiene la reproducción sobre los patrones de distribución, la invasividad y la evolución del hábito anfibio dentro de los miembros de la misma (Hayes 2015).

Por otro lado, se presenta en este trabajo una explicación del comportamiento de descarte de la GA por los depredadores de *P. canaliculata* en base a la nocividad del órgano, algo que podría llegar a ampliarse al resto de las especies del género sobre las cuales depredan empleando el mismo comportamiento. Esto a su vez implicaría que los huevos de estas especies también presentarían proteínas tóxicas, antinutritivas y/o antidigestivas, sustentando la hipótesis de que las mismas son adquisiciones evolutivas propias del género vinculadas con la adquisición de la oviposición aérea, como mecanismo de defensa que proporcionan las hembras a los huevos protegiendo así su desarrollo (Dreon 2010, Dreon 2013).

Por último, se identificó a la biosíntesis como un posible factor limitante de la oviposición a largo plazo, y en relación con esto, la perivitelogénesis, y en particular la expresión de las perivitelininas PcOvo y/o PcPV2, podrían utilizarse como herramienta para evaluar el efecto de factores que afecten la fecundidad de la especie.

8.

Abreviaturas y símbolos

Abs: absorbancia

BSA: albúmina sérica bovina

CD: dicroísmo circular

DE: desvío estándar

EEM: error estándar de la media

FPV: fluido perivitelino

g: aceleración de la gravedad

GA: glándula del albumen

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

kDa: kilodaltons

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PcOvo: perivitelina ovorrubina o PV1 de *Pomacea canaliculata*

PcPV2: perivitelina 2 de *Pomacea canaliculata*

PH: peso húmedo

PS: peso seco

SAXS: dispersión de rayos X a bajo ángulo

UA: unidades arbitrarias

UE: unidad de actividad enzimática

UV: ultravioleta

9.

Bibliografía

- Albrecht EA, Carreño NB, Castro-Vazquez A. 1996. A quantitative study of copulation and spawning in the South American apple-snail, *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae). *Veliger* 39:142-147.
- Albrecht EA, Carreño NB, Castro-Vazquez A. 1999. A quantitative study of environmental factors influencing the seasonal onset of reproductive behaviour in the south American apple-snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies* 65:241-250.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64:5245-5250.
- Beissinger SR. 1983. Hunting behavior, prey selection, and energetics of snail kites in Guyana: consumer choice by a specialist. *The Auk* 100:84-92.
- Bennetts RE, Kitchens WM. 2000. Factors influencing movement probabilities of a nomadic food specialist: proximate foraging benefits or ultimate gains from exploration? *OIKOS* 91:459-467.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911-917.
- Borteiro C, Gutierrez F, Tedros M, Kolenc F. 2009. Food habits of the Broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*: Crocodylia, Alligatoridae) in northwestern Uruguay. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 44:31-36.
- Bourne GR. 1993. Differential snail-size predation by snail kites and limpkins. *OIKOS* 68:217-223.
- Burela S, Martin PR. 2011. Evolutionary and functional significance of lengthy copulations in a promiscuous apple snail, *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies* 77:54-64.
- Burela S, Martín PR. 2009. Sequential pathways in the mating behavior of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia* 51:203-210.
- Bustin SA, et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55:611-622.
- Butzke D, Luch A. 2010. High-molecular weight protein toxins of marine invertebrates and their elaborate modes of action. Pages 213-232 in Luch A, ed. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, vol. Volume 2: Clinical Toxicology. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag.
- Caldeira RL, Mendonça CLGF, Goveia CO, Lenzi HL, Graeff-Teixeira C, Lima WS, Mota EM, Pecora IL, De Medeiros AMZ, Carvalho ODS. 2007. First record of molluscs

naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 102:887-889.

Carlsson NOL, C. B, Hansson LA. 2004. Invading Herbivory: The golden apple snail alters ecosystem functioning in Asian wetlands. Ecology 85:1575-1580.

Catalán NM, Dreon MS, Heras H, Pollero RJ, Fernández SN, Winik B. 2006. Pallial oviduct of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda): ultrastructural studies of the parenchymal cellular types involved in the metabolism of perivitellins. Cell Tissue Research 324:523-533.

Catalán NM. 2007. Aspectos morfológicos y funcionales del oviducto paleal de *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Prosobranchia). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.

Catalán NM, Fernández SN, Winik BC. 2002. Oviductal structure and provision of egg envelopes in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Prosobranchia, Ampullariidae). Biocell 26:91-100.

Cattau CE, Martin J, Kitchens WM. 2010. Effects of an exotic prey species on a native specialist: Example of the snail kite. Biological Conservation 143:513-520.

Collett SF. 1977. Sizes of Snails Eaten by Snail Kites and Limpkins in a Costa Rican Marsh. The Auk 94:365-367.

Cowie RH. 2002. Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: Their biology, impacts, and management. Pages 145-192 in Baker GM, ed. Molluscs as Crop Pests. Wallingford: CABI.

De Francesco CG, Biondi L, Sánchez KB. 2006. Characterization of deposits of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) accumulated by snail kites: paleobiological implications. Iberus 24:39-46.

De Jong-Brink M, Boer HH, Joose J. 1983. Mollusca in Adiyodi KG, Adiyodi RG, eds. Reproductive Biology of Invertebrates, vol. 1. Oogenesis, oviposition and oosorption John Wiley and Sons.

Dorta-Contreras AJ, Reiber H. 2004. Neuroimmunological findings of *Angiostrongylus cantonensis* meningitis in Ecuadorian patients. Rev. Neurol 39:564-569.

Dreon MS, Frassa MV, Ceolin M, Ituarte S, Qiu JW, Sun J, Fernández PE, Heras H. 2013. Novel animal defenses against predation: A snail egg neurotoxin combining lectin and pore-forming chains that resembles plant defense and bacteria attack toxins. PLoS One 8:e63782.

Dreon MS, Heras H, Pollero RJ. 2003. Metabolism of ovorubin, the major egg lipoprotein from the Apple Snail. Molecular and Cellular Biochemistry 243:9-14.

- Dreon MS, Heras H, Pollero RJ. 2004a. Characterization of the major egg glycolipoproteins from the perivitellin fluid of the Apple Snail *Pomacea canaliculata*. *Molluscan Reproduction and Development* 68:359-364.
- Dreon MS, Ituarte S, Ceolín M, Heras H. 2008. Global shape and pH stability of ovorubin, an oligomeric protein from the eggs of *Pomacea canaliculata*. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 275:4522-4530.
- Dreon MS, Ituarte S, Heras H. 2010. The role of the proteinase inhibitor ovorubin in Apple Snail eggs resembles plant embryo defense against predation. *PLoS One* 5:e15059.
- Dreon MS, Lavarias S, Garín CF, Heras H, Pollero RJ. 2002. Synthesis, distribution, and levels of an egg lipoprotein from the Apple Snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Experimental Zoology* 292:323-330.
- Dreon MS, Schinella G, Heras H, Pollero RJ. 2004b. Antioxidant defense system in the Apple Snail eggs, the role of ovorubin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 422:1-8.
- Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- Eckelbarger KJ. 1994. Diversity of metazoan ovaries and vitellogenic mechanisms: Implications for life history theory. *Proceedings of the Biological Society Washington* 107:193-218.
- Estebenet AL. 1998. Allometric growth and insight on sexual dimorphism in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Malacologia* 39:207-213.
- Estebenet AL, Cazzaniga NJ. 1993. Egg variability and the reproductive strategy of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *APEX* 8:129-138.
- Estebenet AL, Martín PR. 2002. *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae): life-history traits and their plasticity. *Biocell* 26:83-89.
- Estebenet AL, Martín PR, Burela S. 2006. Conchological variation in *Pomacea canaliculata* and other South American Ampullariidae (Caenogastropoda, Architaenioglossa). *Biocell* 30:329-335.
- Estela FA, Naranjo LG. 2005. Segregación en el tamaño de caracoles depredados por el gavilan caracolero (*Rostrhamus sociabilis*) y el carrao (*Aramus guarauna*) en el suroccidente de Colombia. *Ornitología Colombiana* 3:36-41.
- Estoy J, Yusa Y, Wada T, Sakurai H, Tsuchida K. 2002. Effects of food availability and age on the reproductive effort of the apple snail, *Pomacea canaliculata* (Lamarck) (Gastropoda: Ampullariidae). *Applied Entomology and Zoology* 37:543-550.

- Frassa MV. 2011. Relaciones estructura-función de las perivitelinas de *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Caenogastropoda). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Frassa MV, Ceolín M, Dreon MS, Heras H. 2010. Structure and stability of the neurotoxin PV2 from the eggs of the Apple Snail *Pomacea canaliculata*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804:1492-1499.
- Garín CF, Heras H, Pollero RJ. 1996. Lipoproteins of the egg perivitellin fluid of *Pomacea canaliculata* snails (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Experimental Zoology* 276:307-314.
- Giglio ML, Ituarte S, Pasquevich MY, Heras H. 2016. The eggs of the apple snail *Pomacea maculata* are defended by indigestible polysaccharides and toxic proteins. *Canadian Journal of Zoology* 94:777-785.
- Giraud-Billoud M, Gamarra Luques C, Castro Vazquez A. 2012. Functional anatomy of male copulatory organs of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Zoomorphology*.
- Hathaway JJ, Adema CM, Stout BA, Mobarak CD, Loker ES. 2010. Identification of protein components of egg masses indicates parental investment in immunoprotection of offspring by *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda, Mollusca). *Developmental and Comparative Immunology* 34:425-435.
- Hayes KA, et al. 2015. Insights from an integrated view of the biology of apple snails (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia* 58:245-302.
- Hayes KA, Cowie RH, Jorgensen A, Schultheis R, Albrecht C, Thiengo SC. 2009a. Molluscan models in evolutionary biology: Apple snails (Gastropoda: Ampullariidae) as a system for addressing fundamental questions. *American Malacological Bulletin* 27:47-58.
- Hayes KA, Cowie RH, Thiengo SC. 2009b. A global phylogeny of apple snails: Gondwanan origin, generic relationships, and the influence of outgroup choice (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 98:61-76.
- Hayes KA, Cowie RH, Thiengo SC, Strong EE. 2012. Comparing apples with apples: Clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae (Caenogastropoda). *Zoological Journal of the Linnean Society* 166:723-753.
- Hayes KA, Joshi RC, Thiengo SC, Cowie RH. 2008. Out of South America: Multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions* 14:701-712.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8:R19.

- Heras H, Dreon MS, Ituarte S, Pollero RJ. 2007. Egg carotenoproteins in neotropical Ampullariidae (Gastropoda: Architaenioglossa). *Comparative Biochemistry and Physiology C* 146:158-167.
- Heras H, Frassa MV, Fernández PE, Galosi CM, Gimeno EJ, Dreon MS. 2008. First egg protein with a neurotoxic effect on mice. *Toxicon* 52:481-488.
- Heras H, Garín CF, Pollero RJ. 1998. Biochemical composition and energy sources during embryo development and in early juveniles of the snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Experimental Zoology* 280:375-383.
- Ituarte S, Dreon MS, Pollero RJ, Heras H. 2008. Isolation and partial characterization of a new lipo-glyco-carotenoprotein from *Pomacea scalaris* (Gastropoda: Ampullariidae). *Molecular Reproduction and Development* 75:1441-1448.
- Koressaar T, Remm M. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23:1289-1291.
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. 2005. *Biología celular y Molecular*, 5ta ed. Editorial Médica Panamericana.
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M. 2000. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. World Conservation Union (IUCN).
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Lv S, Zhang Y, Chen SR, Wang LB, Fang W, Chen F, Jiang JY, Li YL, Du ZW, Zhou XN. 2009. Human angiostrongyliasis outbreak in dali, china. *PLoS. Neglected Tropical Diseases* 3:e520.
- Mapelli FJ, Kittlein MJ. 2011. Prey selection by the Snail Kite (*Rostrhamus sociabilis*) in permanent and temporary wetlands of central Argentina. *Ornitología Neotropical* 22:14.
- Markwell MAK, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE. 1978. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry* 87:206-206.
- Martín PR, Estebenet AL. 2002. Interpopulation variation in life-history traits of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) in southwestern Buenos Aires Province, Argentina. *Malacologia* 44:153-163.
- Martín PR, Estebenet AL, Cazzaniga NJ. 2001. Factors affecting the distribution of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) along its southernmost natural limit. *Malacologia* 43:13-23.
- Moreno FJ, Mellon FA, Wickham MS, Bottrill AR, Mills EN. 2005. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro

gastrointestinal digestion. Federation of European Biochemical Societies Journal 272:341-352.

Mukai ST, Hoque T, Morishita F, Saleuddin AS. 2004. Cloning and characterization of a candidate nutritive glycoprotein from the albumen gland of the freshwater snail, *Helisoma duryi* (Mollusca: Pulmonata). Invertebrate Biology 123:83-92.

Nagle GT, de Jong-Brink M, Painter SD, Li KW. 2001. Structure, localization and potential role of a novel molluscan trypsin inhibitor in *Lymnaea*. European Journal of Biochemistry 268:1213-1221.

National Institute of Health (NIH). 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press.

Pasquevich MY, Dreon MS, Heras H. 2014. The major egg reserve protein from the invasive apple snail *Pomacea maculata* is a complex carotenoprotein related to those of *Pomacea canaliculata* and *Pomacea scalaris*. Comparative Biochemistry and Physiology 169 B:63-71.

Petoukhov MV, Franke D, Shkumatov AV, Tria G, Kikhney AG, Gajda M, Gorba C, Mertens HD, Konarev PV, Svergun DI. 2012. New developments in the program package for small-angle scattering data analysis. Journal of Applied Crystallography 45:342-350.

Posso SR, Cintra FB, Frias J. 2012. Temporal influence on foraging strategies, territoriality and nomadic tendencies of Snail Kite, *Rostrhamus sociabilis* (Viellot, 1817) in an urban Neotropical wetland. 72(2), 235-241. Brazilian Journal of Biology 72:7.

Raikhel AS, Sappington TW. 2002. Reproductive Biology of invertebrates Vol XII, A. Progress in Vitellogenesis. Science Publishers Inc.

Ruhnan N. 1988. Vol III. Accessory sex glands. Mollusca. Reproductive Biology of Invertebrates, vol. Vol III. Accessory sex glands. Chester: John Wiley and Sons.

Sanchez JF, Lescar J, Chazalet V, Audfray A, Gagnon J, Alvarez R, Breton C, Imberty A, Mitchell EP. 2006. Biochemical and structural analysis of *Helix pomatia* agglutinin. A hexameric lectin with a novel fold. Journal of Biological Chemistry 281:20171-20180.

Seuffert ME, Burela S, Martín PR. 2010. Influence of water temperature on the activity of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) at its southernmost limit (Southern Pampas, Argentina). Journal of Thermal Biology 35:77-84.

Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. BMC Mol Biol 7:33.

Slom T, Johnson S. 2003. Eosinophilic Meningitis. Current Infectious Disease Reports 5:322-328.

Snyder NFR, Kale HW. 1983. Mollusk predation by Snail Kites in Colombia. *The Auk* 100:93-97.

Snyder NFR, Snyder HA. 1969. A comparative study of mollusk predation by limpkins, Everglade kites, and boat-tailed grackles. *Living bird* 8:177-223.

Snyder NFR, Snyder HA. 1971. Defenses of the Florida Apple Snail *Pomacea paludosa*. *Behaviour* 40:175-215.

Sun J, Wang M, Wang H, Zhang H, Zhang X, Thiyagarajan V, Qian PY, Qiu JW. 2012a. *De novo* assembly of the transcriptome of an invasive snail and its multiple ecological applications. *Molecular Ecology Resources* 12:1133-1144.

Sun J, Zhang H, Wang H, Heras H, Dreon MS, Ituarte S, Ravasi T, Qian PY, Qiu JW. 2012b. First proteome of the egg perivitelline fluid of a freshwater gastropod with aerial oviposition. *Journal of Proteome Research* 11:4240-4248.

Svergun DI. 1992. GNOM 4.5. *Journal of Applied Crystallography* 25:495-503.

Svergun DI. 1999. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophysical Journal* 76:2879-2886.

Sykes PW, Jr. 1987. The feeding habits of the Snail Kite in Florida, USA. *Colonial Waterbirds* 10:84-92.

Takamatsu N, Shiba T, Muramoto K, Kamiya H. 1995. Molecular cloning of the defense factor in the albumen gland of the sea hare *Aplysia kurodai*. *Federation of European Biochemical Societies letters* 377:373-376.

Tamburi NE, Martín PR. 2009. Feeding rates and food conversion efficiencies of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia* 51:221-232.

Tamburi NE, Martín PR. 2011. Effects of food availability on reproductive output, offspring quality and reproductive efficiency in the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biological Invasions* 13:2351-2360.

Tamburi NE, Martín PR. 2016. Effects of absolute fasting on reproduction and survival of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata* in its native range. *Current Zoology*:zow023.

Tanaka MO, Souza ALT, Modena ES. 2006. Habitat structure effects on size selection of snail kites (*Rostrhamus sociabilis*) and limpkins (*Aramus guarauna*) when feeding on apple snails (*Pomacea* spp.). *Acta Oecologica* 30:88-96.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3, new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40:e115.

- Valle D. 1993. Vitellogenesis in insects and other groups-a review. Mem. Inst Oswaldo Cruz 88:1-26.
- Van Handel E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. Analytical Biochemistry 11:256-265.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biolology 3:RESEARCH0034.
- Wallace RA, Walker SL, Hauschka PV. 1967. Crustacean lipovitellin: isolation and characterization of the major high-density lipoprotein from eggs of decapods. Biochemistry 6:1582-1590.
- Wijsman TCM, Wijck-Batenburg H. 1987. Biochemical composition of the eggs of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* and oviposition-induced restoration of albumen gland secretion. International Journal of Invertebrate Reproduction and Development 12:199-212.
- Xu Y, Zheng G, Dong S, Liu G, Yu X. 2014. Molecular cloning, characterization and expression analysis of HSP60, HSP70 and HSP90 in the golden apple snail, *Pomacea canaliculata*. Fish and Shellfish Immunology 41:643-653.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13:134.
- Yoshie H, Yusa Y. 2008. Effects of predation on the exotic freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae) by the indigenous turtle *Chinemys reevesii* (Testudines: Geoemydidae). Applied Entomology and Zoology 43:475-482.
- Yusa Y. 2001. Predation on eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae) by the fire ant *Solenopsis geminata*. Journal of Molluscan Studies 67:275-279.
- Yusa Y, Sugiura N, Ichinose K. 2000. Predation on the apple snail, *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae), by the Norway rat, *Rattus norvegicus*, in the field. Veliger 43:349-353.
- Zheng G, Dong S, Hou Y, Yang K, Yu X. 2012. Molecular characteristics of HSC70 gene and its expression in the golden apple snails, *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). Aquaculture 358-359:41-49.

10.

Apéndice

Evaluación de la selección de presas por parte del gavilán caracolero en función de la talla y el sexo de las presas

Muestreo

Se determinó la talla y el sexo de cada presa consumida a partir de un muestreo mensual de los depósitos de conchillas de los posaderos de gavilanes caracoleros en el dique Piedras Moras (32°10'23"S; 64°14'57"O, Córdoba, Argentina) entre octubre de 2011 y marzo de 2012. La única presa disponible para los caracoleros de la zona era *P. canaliculata*, para la cual a su vez se realizó un censo mensual de las tallas y sexos de la población mediante un vadeo estandarizado (Burela y Martin 2014), con el fin de conocer la disponibilidad de presas para el depredador.

Índice de forrajeo y análisis estadístico

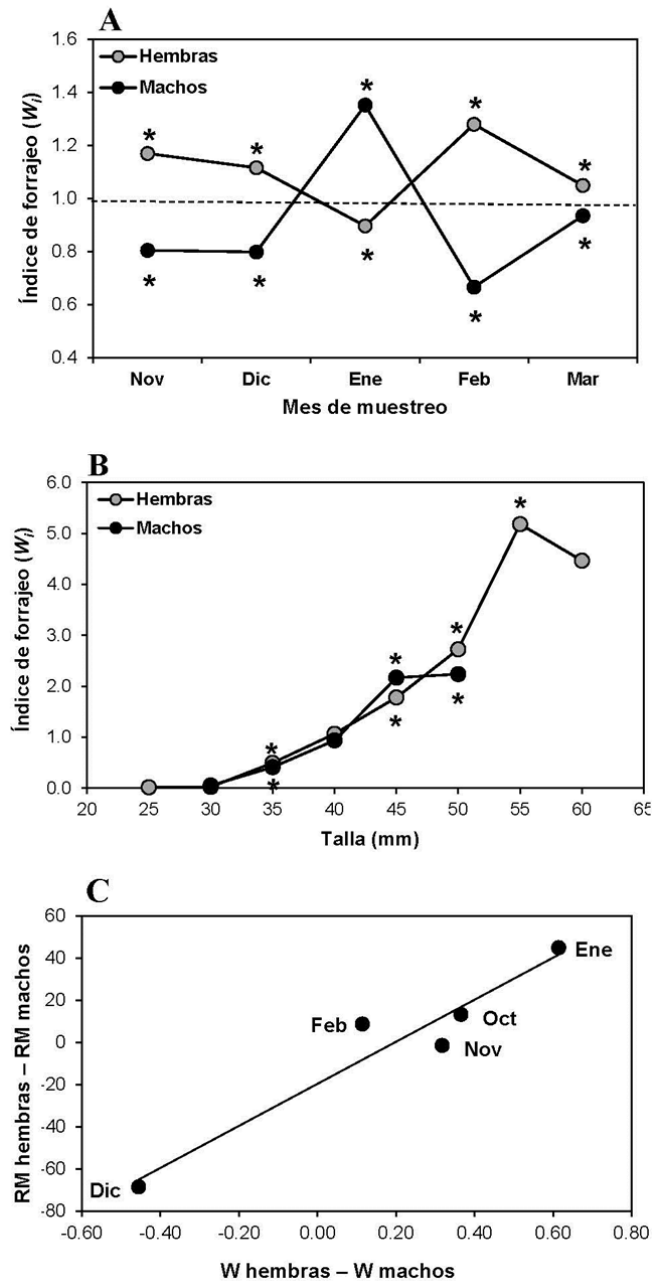
Los datos fueron evaluados utilizando clases de tallas. Para evaluar selección de presas en función del sexo y en función de la talla, los datos de disponibilidad de cada mes se analizaron con los datos de presas consumidas del mes siguiente, y se calculó el índice de proporción de forrajeo de Manly et. al. (2002). El mismo se define como: $W_i = U_i / A_i$. Donde W_i = índice de forrajeo para el ítem i , U_i = proporción del ítem i en la dieta (depósitos de conchillas) y A_i = proporción del ítem i disponible en el ambiente (población). El estadístico $(W_i - 1)^2 / ES (W_i)^2$ fue calculado de acuerdo a Manly et al. (2002) y se comparó con un valor crítico de Chi-cuadrado con un grado de libertad. El índice de forrajeo y los estadísticos asociados fueron calculados reuniendo las muestras de todo el período de muestreo, discriminando sexos y clases de tallas. A su vez se calcularon estos mismos parámetros para cada sexo mensualmente, considerado las tallas en conjunto.

El grado de preferencia en la selección de presas en función del sexo para cada mes se estimó como la diferencia entre W_i de hembras y machos. Las diferencias en las tallas entre hembras y machos de la población fueron analizadas mediante un test de rango de dos muestras de Mann-Whitney (Zar 1984). El grado de dimorfismo sexual en la talla para cada mes fue estimado como la diferencia en el rango medio entre hembras y machos. Se estableció un nivel de significancia del 5% para evaluar los resultados.

Resultados

En total se censaron 1571 caracoles vivos y se recolectaron 2564 conchillas vacías de los depósitos generados por los caracoleros. La población presentó una talla promedio de $36,11 \pm 6,11$ mm, mientras que la talla promedio consumida fue de $40,80 \pm 4,72$ mm. La proporción de sexos en la población estuvo desviada hacia las hembras (61,8%) así como en las pilas de conchillas (67,4%).

El índice de forrajeo (W_i) indicó un consumo preferencial de hembras en todos los meses evaluados, excepto por el mes de enero (Fig. A); y para ambos sexos, las tallas >40 mm mostraron una selección positiva mientras que aquellas <30 mm presentaron una selección negativa o no fueron depredadas en absoluto (Fig. B). La comparación de las tallas de la población entre sexos mostró que las hembras sobrepasaron significativamente a los machos en octubre ($P = 0,018$) y enero ($P = 0,001$), mientras que los machos sobrepasaron a las hembras sólo en el mes de diciembre (Chi-cuadrado = 26,7; $P = 0,001$). En noviembre y febrero tales diferencias no fueron significativas ($P = 0,83$ y $P = 0,45$, respectivamente). Por último, hubo una correlación significativa ($r = 0,96$, $P = 0,008$) entre el grado en que las hembras sobrepasaron en talla a los machos en un determinado mes y el grado de preferencia de los depredadores por las hembras en el mismo período (Fig. C).



Selección de presas por parte del gavián caracolero. **A)** Índice de forrajeo (W_i) para machos y hembras en función del mes de muestreo y **B)** en función de la talla. El índice considera la proporción del ítem en la dieta (determinada a partir de los depósitos de conchillas) y su disponibilidad en el ambiente (determinada a partir del censo de la población de caracoles). Valores <1 y >1 indican selección negativa y positiva, respectivamente. * Desviación significativa respecto al valor de no selección ($W_i = 1,0$). **C)** Grado en que las hembras sobrepasan en talla a los machos (RM hembras - RM machos) vs. el grado de preferencia de los depredadores por las hembras (W hembras - W machos).

Referencias bibliográficas

Burela S, Martin PR. 2014. Nuptial gifts in *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae, Caenogastropoda): Experimental and field evidence about their function. *Malacologia* 57:319-327.

Manly BF, McDonald L, Thomas D, McDonald TL, Erickson WP. 2002. Resource selection by animals. Statistical design and analysis for field studies, 2nd ed. Kluwer Academic Publishers.

Zar JH. 1984. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall.